

Université de Sherbrooke

Synthèse et relations structure-fonction de nouveaux analogues de l'apéline-13

Par
Alexandre Murza
Programme de Pharmacologie

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en Pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Février 2015

Membres du jury d'évaluation

- Pr David Chatenet, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier, Évaluateur externe à l'université
- Pre Jana Stankova, Ph.D.
Programme d'Immunologie, Évaluateur externe au programme
- Pr Philippe Sarret, Ph.D.
Programme de Physiologie, Directeur de recherche
- Pr Éric Marsault, Ph.D.
Programme de Pharmacologie, Directeur de recherche
- Pr Michel Grandbois, Ph.D.
Programme de Pharmacologie, Directeur du programme

© Alexandre Murza, 2015

*A ma famille, mes amis, et ceux
qui m'ont toujours soutenu*

L'imagination est plus importante que le savoir
Albert Einstein

Une petite impatience ruine un grand projet
Confucius

Le doute est le commencement de la sagesse
Aristote

Partir, c'est mourir un peu, mais mourir, c'est partir beaucoup
Alphonse Allais

RÉSUMÉ

Synthèse et relations structure-fonction de nouveaux analogues de l'apéline-13

Par

Alexandre Murza

Programme de doctorat en Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'apéline est le ligand endogène du récepteur APJ, un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Le système apélinergique est apparu comme une cible prometteuse associée à plusieurs processus physiologiques. Notre intérêt s'est porté particulièrement sur les rôles liés au système cardiovasculaire et à la modulation de la douleur. Nous posons l'hypothèse que la synthèse d'analogues de l'apéline-13 nous permettrait d'identifier d'une part des composés plus stables et d'autre part les voies de signalisation impliquées dans la modulation de la douleur, les effets hypotenseurs et cardioprotecteurs de notre cible. Ces outils pharmacologiques contribueront ultimement à concevoir un agent thérapeutique pour le traitement de la douleur chronique et des maladies cardiovasculaires. Les données de relations structure-fonction de l'apéline-13 révèlent la présence de deux pharmacophores distants importants. Le fragment N-terminal Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ semble primordial pour l'affinité, alors que la Phe¹³ C-terminale serait cruciale pour l'internalisation du récepteur et les effets hypotenseurs. Afin de mieux comprendre les relations structure-fonction de l'apéline-13, nous avons synthétisé près d'une centaine d'analogues linéaires et macrocycliques. Les composés ont été évalués pour leurs capacités à lier APJ, à inhiber la formation d'AMPc, à recruter les β -arrestines et à activer les protéines G $\alpha_{i/o}$. Une variété de modifications chimiques a été introduite en C-terminal, nous conduisant à la découverte de composés de haute affinité et puissance. Deux analogues, 1Nal¹³ et 2Nal¹³, se sont distingués pour leurs différences d'effets analgésiques dans un modèle *in vivo* de douleur tonique. Ces derniers présentent une intéressante divergence de sélectivité fonctionnelle suggérant que l'effet analgésique serait associé à un biais favorisant le recrutement des β -arrestines par rapport à l'inhibition de l'accumulation d'AMPc. Un autre volet du projet dédié à l'investigation de la stabilité plasmatique de l'apéline-13 nous a permis d'identifier son profil de dégradation protéolytique *in vitro* et *in vivo*. L'évaluation des demi-vies plasmatiques des analogues de l'apéline-13, modifiés à des positions clés, a révélé l'importance de l'acide aminé C-terminal dans la stabilité plasmatique. Enfin, une étude préliminaire de SAR par une approche macrocyclique novatrice du ligand endogène nous a conduit à un composé induisant un effet hypotenseur deux fois supérieur à celui de l'apéline-13. Un autre macrocycle a, quant à lui, démontré une sélectivité fonctionnelle inédite, n'activant pas la voie AMPc mais provoquant le recrutement de la β -arrestine2. Cette classe de molécules, potentiellement plus stables, a un grand potentiel pour nous aider à identifier les voies de signalisation liées aux effets physiologiques d'intérêts, et représente surtout un premier pas vers un futur agent thérapeutique. Mots clés: apéline, APJ, peptide, macrocycle, stabilité plasmatique, signalisation, douleur, hypotension.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
INTRODUCTION	1
1. La famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	1
1.1. Généralités	1
1.2. Structure et signalisation des RCPG	3
1.3. Importance physiologique et thérapeutique	5
2. Le système apéline-APJ	6
2.1. Découverte	6
2.2. Structures de l'apéline	8
2.3. Dégradation de l'apéline	10
2.4. Distribution tissulaire	11
2.4.1. Distribution du récepteur APJ	11
2.4.2. Distribution de l'apéline	13
2.5. Rôles physiologiques et physiopathologiques	16
2.5.1. Rôles sur le système cardiovasculaire	16
2.5.2. Rôles au niveau central sur la douleur	19
2.5.3. Rôles au niveau de l'axe adipo-insulaire	20
2.5.4. Autres rôles	22
2.6. Voies de signalisation	24
2.6.1. Signalisation dépendante des protéines G	24
2.6.2. Signalisation indépendante des protéines G	30

3. La relation structure-fonction du système apéline-API	33
4. Le concept de sélectivité fonctionnelle ou de signalisation biaisée "ligand-biased signaling"	47
4.1. Définitions.....	47
4.2. Intérêts thérapeutiques de la sélectivité fonctionnelle	48
5. Les techniques de transfert par résonance non radiative	49
5.1. Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).....	50
5.2. Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET).....	52
6. Les macrocycles comme outils dans la découverte de nouveaux médicaments	54
PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES	58
ARTICLE 1.....	60
ARTICLE 2.....	85
ARTICLE 3.....	111
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES & DISCUSSION.....	141
1. Étude D-scan de l'apéline-13	141
2. Étude du résidu C-terminal de l'apéline-13	143
3. Étude des analogues 1Nal ¹³ et 2Nal ¹³ de l'apéline-13	147
4. Étude du résidu Pro ¹² de l'apéline-13	150
5. Étude de la stabilité plasmatique et du profil de dégradation de l'apéline-13 et de ses analogues.....	151
6. Étude de la portion centrale de l'apéline-13.....	155
7. Approche macrocyclique: première série d'analogues macrocycliques de l'apéline-13 et résultats préliminaires.....	156
CONCLUSION.....	167
REMERCIEMENTS.....	170
ANNEXES.....	172
BIBLIOGRAPHIE.....	254

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Distribution tissulaire de l'ARNm du récepteur APJ et de son ligand l'apéline chez l'humain, la souris et le rat.....	14
Tableau 2. Affinités et puissances sur les voies AMPc et Ca ²⁺ de l'alanine scan de l'apéline-13 et de divers analogues	34
Tableau 3. Essais de radioliation et sur différentes voies de signalisation de l'apéline-13 et des analogues 1Nal ¹³ et 2Nal ¹³	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Classification phylogénique des 3 grandes classes de RCPG chez l'humain	2
Figure 2. Diversité des stimuli extracellulaires et signalisations intracellulaires des RCPG	4
Figure 3. Séquences en acides aminés des récepteurs de l'apéline (rat, souris et humain)	7
Figure 4. Maturation de l'apéline conduisant à ses différents isoformes chez le rat.....	8
Figure 5. Alignement des séquences de l'apéline chez le bœuf, l'humain, le rat et la souris.	9
Figure 6. Distribution dans le système nerveux central et les tissus périphériques de l'ARNm du récepteur APJ humain	12
Figure 7. Les effets du complexe apéline-APJ sur le système cardiovasculaire.....	17
Figure 8. Les effets de l'apéline sur le métabolisme énergétique chez les souris obèses et insulino-résistantes.....	21
Figure 9. Signalisation intracellulaire responsable de l'effet inotrope positif de l'apéline... ..	26
Figure 10. Signalisation intracellulaire responsable des effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs du complexe apéline-APJ.....	28
Figure 11. Représentation non exhaustive des voies de signalisation, dépendantes des protéines G, activées par APJ	30
Figure 12. Représentation non-exhaustive des voies de signalisation dépendantes des β -arrestines	32
Figure 13. Diminutions maximales par rapport au niveau basal des pressions artérielles moyennes (MABP) induites par les différents analogues de l'apéline-13 dont la Phe ¹³ est modifiée et effet antagoniste de l'analogue F13A chez les rats Wistar ou SHR mâles	36
Figure 14. Structures de l'apéline-13, -12 et des dérivés cycliques	37
Figure 15. Ensemble de structures de l'apéline-17 dans l'eau, déterminées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, présentant les régions les plus structurées	38
Figure 16. Modélisation moléculaire de l'arrimage de l'apéline-13 ou -17 dans le récepteur humain APJ: Interactions de la Phe C-terminale	40
Figure 17. Structures chimiques du E339-3D6 (gauche) et du ML221 (droite)	43
Figure 18. Structure des 55 premiers acides aminés d'APJ (région N-terminale et 1 ^{er} domaine transmembranaire) obtenue par spectroscopie RMN et modélisation moléculaire	45

Figure 19. Schéma explicatif d'une signalisation balancée, biaisée par le ligand ou par le récepteur.....	48
Figure 20. Représentation du transfert d'énergie de type FRET	51
Figure 21. Représentation du transfert d'énergie de type BRET et BRET ²	53
Figure 22. Structures chimiques de la Rapamycine, la Cyclosporine, l'Erythromycine, le Cilengitide, le Ciluprevir, et le TZP-101 (Ulimorelin).....	57
Figure 23. Test à la formaline chez le rat mâle Sprague-Dawley de l'apéline-13 et des analogues 1Nal ¹³ et 2Nal ¹³	148
Figure 24. Modélisation moléculaire des chaînes latérales des analogues 1Nal et 2Nal dans la pochette de liaison d'APJ	149
Figure 25. Conception du premier analogue macrocyclique de l'apéline-13.....	158
Figure 26. Effets du déplacement du Tyr(OBn) sur l'affinité et la signalisation	159
Figure 27. Effets sur l'affinité et la signalisation de l'insertion d'un acide aminé entre le Tyr(OBn) et le cycle	160
Figure 28. Effets de la modification du squelette macrocyclique sur l'affinité et la signalisation	162
Figure 29. Modifications du fragment N-terminal du macrocycle référence AM02-24 et résultats en radioliation	163
Figure 30. Effets hypotenseurs de l'apéline-13 et de 2 analogues macrocycliques chez le rat mâle Sprague-Dawley	165

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE2: *Angiotensin converting enzyme 2*; Enzyme de conversion de l'angiotensine 2
ACTH: Adrénocorticotrophine
ADP: Adenosine diphosphate
AMPc: Adenosine monophosphate cyclique
AMPK: *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*; Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
ARNm: Acide ribonucléique messenger
APJ: *Apelin Peptide Jejunum*
ATP: Adenosine triphosphate
AT1: Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AVP: Arginine-vasopressine
BFP: *Blue fluorescent protein*; Protéine fluorescente bleue
BLT1: *Leukotriene B4 receptor 1*; Récepteur aux leucotriènes B4 de type 1
BRET: *Bioluminescence resonance energy transfer*; Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence
CCKR: *Cholecystokinin receptor*; Récepteur de la Cholecystokinine
CD: *Circular dichroism*; Dichroïsme circulaire
CFP: *Cyan fluorescent protein*; Protéine fluorescente cyan
CHO: *Chinese hamster ovary*; Ovaire de hamster chinois
DAG: Diacylglycérol
cADN: Acide désoxyribonucléique complémentaire
E: Entgegen
ECL: *Extracellular loop*; Boucle extracellulaire
EGF: *Epidermal growth factor*; Facteur de croissance de l'épiderme
EGFR: *Epidermal growth factor receptor*; Récepteur du facteur de croissance de l'épiderme
EGFP: *Extended green fluorescent protein*; Protéine fluorescente verte renforcée
ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase*; Kinase régulant le signal extracellulaire
FFA: *Free fatty acids*; Acides gras libres
FLIPR: *Fluorescent imaging plate reader*; Lecteur de plaque par imagerie de fluorescence
FRET: *Förster / fluorescence resonance energy transfer*; Transfert d'énergie par résonance de fluorescence / de type Förster
GDP: Guanosine diphosphate
GFP: *Green fluorescent protein*; Protéine fluorescente verte
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
Gp2A: Glycoprotéine 2A
GRK: *G protein regulated kinase*; Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP: Guanosine triphosphate
HEK: *Human embryonic kidney*; Embryon de rein humain
HPLC: *High performance liquid chromatography*; Chromatographie liquide haute performance
HSL: *Hormone sensitive lipase*; Lipase sensible aux hormones
HTS: *High throughput screening*; Criblage à haut débit

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells*; Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
 ICL: *Intracellular loop*; Boucle intracellulaire
 i.c.v.: intracérébroventriculaire
 i.t.: intrathécale
 i.v.: intraveineuse
 IP: Inositol Phosphate
 IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphate
 Jak/STAT: *Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription*; Kinase Janus / Transducteurs de signal et activateurs de la transcription
 KO: *Knock-out*
 KOR: *κ-opioid receptor*; Récepteurs aux opioïdes κ
 LC/MS: *Liquid chromatography / mass spectrometry*; Chromatographie liquide / spectrométrie de masse
 MABP: *Mean arterial blood pressure*; Pression artérielle moyenne
 MS: *Mass spectrometry*; Spectrométrie de masse
 mTOR: *Mammalian target of Rapamycin*; Cible mammaire de la Rapamycine
 NCX: *Sodium-calcium exchanger*; Echangeur sodium-calcium
 nM: Nanomolaire
 NO *Nitric oxide*; Oxyde nitrique
 NOS: *Nitric oxide synthase*; Oxyde nitrique synthase
 eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase*; Endothéliale oxyde nitrique synthase
 PCR: *Polymerase chain reaction*; Réaction de polymérase en chaîne
 PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
 PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
 PKA: Protéine kinase A
 PKC: Protéine kinase C
 PLC: Phospholipase C
 PSA: *Polar surface area*; Surface polaire
 PTX: *Pertussis toxin*; Toxine pertussique
 PVN: *Paraventricular nucleus*; Noyau paraventriculaire
 Raf: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*; Accélère rapidement le fibrosarcome
 Ras: *Rapidly accelerated sarcoma*; Accélère rapidement le sarcome
 RCM: *Ring closing metathesis*; Fermeture de cycle par métathèse des oléfines
 RCPG: Récepteur couplé aux protéines G
 RET: *Resonance energy transfer*; Transfert d'énergie par résonance
 RFP: *Red fluorescent protein*; Protéine fluorescente rouge
 Rluc: Renilla Luciférase
 RMN: Résonance magnétique nucléaire
 RT-PCR: *Real-time polymerase chain reaction*; Réaction de polymérase en chaîne en temps réel
 SAR: *Structure/activity relationship*; Relation structure/activité
 SHR: *Spontaneously hypersensible rat*; Rat spontanément hypertendu
 SON: *Supraoptic nucleus*; Noyau supraoptique
 TGFα: *Transformation growth factor α*; Facteur de croissance de transformation α
 TM: Domaine transmembranaire

UPLC/MS: *Ultra performance liquid chromatography / mass spectrometry*;

Chromatographie liquide ultra performante / spectrométrie de masse

YFP: *Yellow fluorescent protein*; Protéine fluorescente jaune

Z: Zusammen

INTRODUCTION

1. La famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

1.1. Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une grande famille de protéines à 7 domaines transmembranaires responsables de la conversion d'un signal extracellulaire, provoqué par la liaison d'un ligand au récepteur en signal intracellulaire. Ces récepteurs sont ainsi nommés (RCPG) car suite à leur activation, ils vont se coupler à des protéines hétérotrimériques liant le guanosine triphosphate (GTP). Les RCPG sont une cible pharmacologique de grande importance car ils sont présents en abondance, plus de 750 récepteurs différents identifiés chez l'humain (Takeda et al., 2002; Vassilatis et al., 2003), et ils constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires des mammifères (3.4% du génome) (Bockaert and Pin, 1999; Gershengorn and Osman, 2001). La majorité de ces récepteurs (environ 500) est importante pour des fonctions physiologiques de base telles que l'odeur et le goût (Takeda et al., 2002). Les RCPG peuvent être activés par divers types de ligands allant du simple stimulus (photon par exemple) à des molécules odorantes en passant par des hormones, acides aminés et nucléotides (Fredriksson and Schiöth, 2005). Les RCPG sont divisés en cinq grandes familles (glutamate-, rhodopsin-, adhesion-, frizzled-, et secretin-like), ces noms proviennent du premier récepteur de cette classe qui a été identifié (Fredriksson et al., 2003; Perez, 2003). Les familles rhodopsin-like et secretin-like sont également appelées RCPG classes A et B respectivement, tandis que les trois autres familles sont associées à la classe C (**Figure 1**) (Gether, 2000). Selon certaines nomenclatures la classe C peut être divisée en une classe D contenant les récepteurs frizzled- et smoothened- ainsi qu'une classe E pour le récepteurs à l'AMPc (Krishnan et al., 2012).

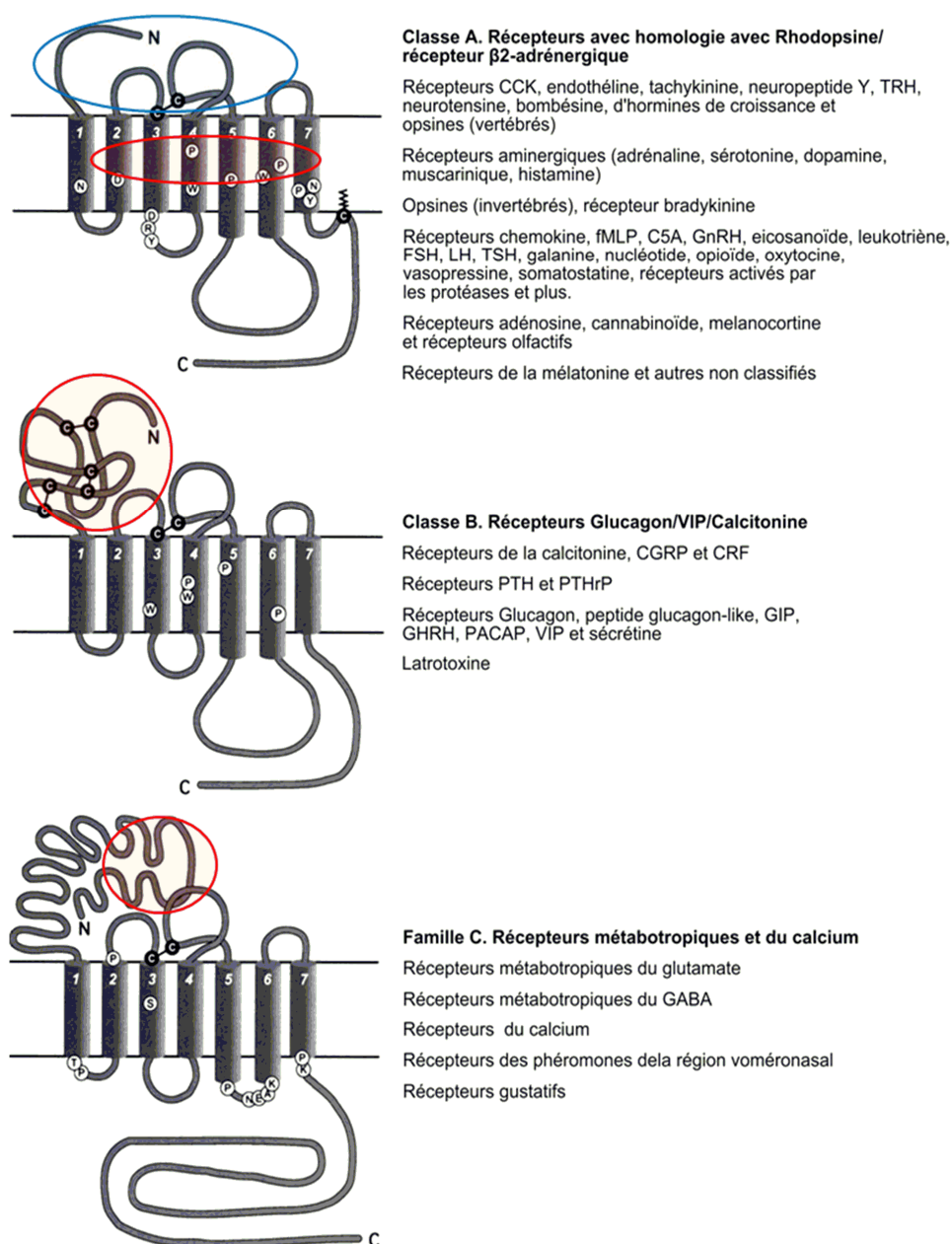


Figure 2. Classification phylogénique des 3 grandes classes de RCPG chez l'humain.

La classe A est divisée en 6 sous classes, la classe B compte 4 sous classes tandis que la classe C en compte 5. Les résidus et les ponts disulfures hautement conservés sont respectivement identifiés par une lettre noire et par un C blanc. Concernant la classe A, le site orthostérique des ligands de faible masse moléculaire (par exemple les amines biogéniques) se situe au niveau du cercle bleu, les ligands de plus haute masse moléculaire comme les peptides se lient dans les domaines transmembranaires (indiqués en rouge). Pour les classes B et C, les sites orthostériques se situent sur la partie N-terminale extracellulaire (adaptée de Gether, 2000).

1.2. Structure et signalisation des RCPG

Les RCPG sont des protéines composées d'une seule chaîne polypeptidique à sept domaines transmembranaires formant trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Le domaine N-terminal ainsi que les trois boucles extracellulaires ont un rôle important pour l'interaction avec les différents ligands. Les sept domaines transmembranaires sont composés majoritairement d'acides aminés hydrophobes qui adoptent une structure secondaire en hélice α . Le domaine C-terminal est exposé au milieu cytoplasmique, des modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation ou la phosphorylation offrent une fonction régulatrice de l'activité des RCPG (Lefkowitz, 2004). La caractérisation structurale de ces récepteurs représente un défi dû aux caractéristiques transmembranaires de ces protéines. Au cours des dernières années, l'utilisation de la cristallographie par diffraction des rayons X a permis d'obtenir des structures de haute résolution de 24 RCPG, certains en présence de leur ligand, offrant ainsi un apport considérable dans l'avancement de la compréhension de l'interaction entre un ligand et son récepteur (Jaakola et al., 2008; Warne et al., 2008; Chien et al., 2010). La première structure cristalline de RCPG fut celle de la rhodopsine en 2000 (Palczewski et al., 2000), puis sept ans plus tard celle du récepteur β_2 -adrénergique (Cherezov et al., 2007; Rosenbaum et al., 2007). Ces dernières années, la résolution des structures cristallines de RCPG s'est grandement accélérée, laissant envisager qu'un grand nombre de ces structures soit déterminé dans un avenir proche.

Le RCPG est composé d'un récepteur interagissant avec une protéine G ayant 3 sous-unités ($G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$). $G\beta$ et $G\gamma$ forment un hétérodimère noté $G\beta\gamma$ qui s'associe au récepteur via la sous-unité $G\alpha$. Il existe plusieurs isoformes de ces différentes sous-unités, notamment $G\alpha$ qui connaît 4 sous-types majeurs ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$). A l'état inactif, cette dernière est liée à la guanosine diphosphate (GDP), puis l'activation par un stimulus extracellulaire provoque un changement de conformation du RCPG entraînant l'échange du GDP en guanosine triphosphate (GTP). Ce phénomène est accompagné d'une dissociation de la protéine $G\alpha$ de l'hétérodimère $G\beta\gamma$ (Kimple et al., 2011). Après la stimulation, les protéines G se dissocient du RCPG tout en restant associées à la membrane. Les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ vont activer une grande variété de voies de signalisation à l'intérieur de la cellule

telles que les adénylates cyclases ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$), les isoformes de la phospholipase C ($G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$), les RhoGEFs ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$) et de nombreux canaux ioniques et autres protéines kinases ($G\beta\gamma$) (Clapham and Neer, 1997; Kozasa et al., 1998; Simonds, 1999; Kammermeier et al., 2000). Plusieurs types de stimuli extracellulaires peuvent activer un RCPG, les effecteurs intracellulaires mènent par la suite à des processus biologiques vitaux pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme (**Figure 2**).

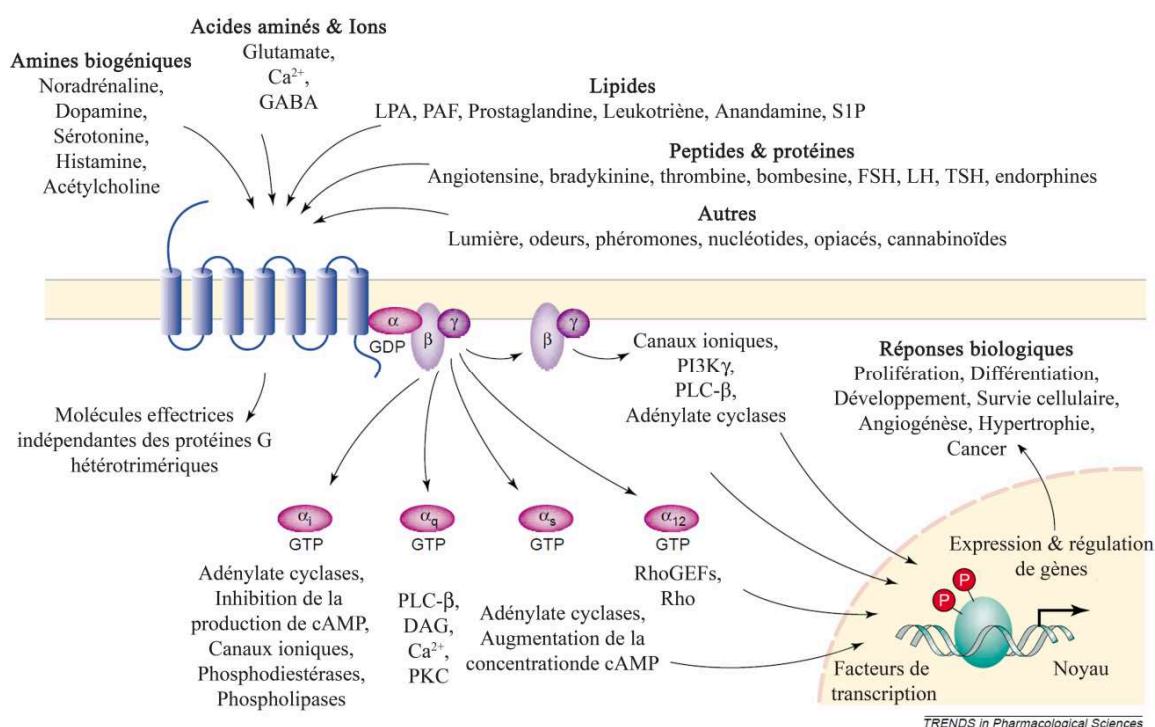


Figure 2. Diversité des stimuli extracellulaires et signalisation intracellulaire des RCPG. Les RCPG sont activés par une très grande variété de stimuli extracellulaires puis vont activer à leurs tours de nombreux effecteurs intracellulaires dépendants et indépendants des protéines G menant à des réponses biologiques (adaptée de Marinissen and Gutkind, 2001).

Il existe également des mécanismes signalétiques indépendants des protéines G. En effet, le RCPG, suite à son activation, peut être phosphorylé par des kinases (GRK), provoquant le recrutement d'autres protéines telles que les β -arrestines (Brzustowski and Kimmel, 2001). Généralement, ces dernières entraînent la désensibilisation du RCPG et son internalisation, puis des voies de signalisation dépendantes des β -arrestines, comme les ERK (extracellular regulated kinases), peuvent être activées (Ma and Pei, 2007). Il faut

souligner que d'autres effecteurs signalétiques incluant la famille des kinases Jak ou des échangeurs Na^+/H^+ sont susceptibles d'entrer en jeu indépendamment des protéines G (Brzostowski and Kimmel, 2001). Enfin, de nombreuses études ont mis en évidence que la dimérisation d'un RCPG avec un autre peut être induite par le biais du stimulus extracellulaire, le dimère ainsi formé activera alors des voies de signalisation différentes du RCPG d'intérêt seul (Terrillon and Bouvier, 2004).

1.3. Importance physiologique et thérapeutique

Les RCPG constituent la plus grande famille de protéines membranaires impliquées dans la transduction du signal. D'innombrables processus physiologiques dépendent de ces récepteurs, leurs dysfonctionnements sont donc à la source de multiples pathologies (Thompson et al., 2005; Lania et al., 2006; Tao, 2006). Le séquençage du génome humain a mis en lumière presque tous les RCPG, y compris certains dont la fonction et/ou le ligand sont encore inconnus (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), représentant ainsi environ 3.4% du génome humain et 750 gènes. Approximativement 375 gènes codent pour des RCPG ayant des ligands endogènes et plus de 180 sont des récepteurs orphelins, en d'autres termes, n'ayant aucun ligand connu (Fredriksson et al., 2003; Vassilatis et al., 2003). D'un point de vue thérapeutique, les RCPG de classe A sont la cible pharmacologique de près de 25% des médicaments sur le marché (Overington et al., 2006). Actuellement, les traitements ne visent qu'un très faible pourcentage des RCPG connus (moins de 5%), suggérant que de potentielles cibles thérapeutiques restent encore à explorer (Lagerström and Schiöth, 2008).

2. Le système apéline-APJ

2.1. Découverte

Le récepteur APJ fait partie de la famille des RCPG de classe A. Il a été identifié en 1993 par O'Dowd et ses collaborateurs sur la bande q12 du chromosome 11 humain (O'Dowd et al., 1993). Cette découverte a été fortuite, en effet les auteurs recherchaient des homologues du récepteur à la vasopressine dans le cerveau humain. Ce gène a été cloné par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide d'amorces basés sur les séquences conservées des parties transmembranaires des RCPG. Le cDNA code pour une préprotéine de 377 acides aminés. APJ présente 30% d'homologie de séquence avec le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1). Dans les régions transmembranaires, l'homologie s'élève même à 54% avec AT1 faisant de ce dernier le récepteur connu le plus homologue à APJ. Plus rarement, nous pouvons trouver d'autres appellations d'APJ dans la littérature: AGTRL1 pour angiotensin-II receptor-like 1, APLNR ou plus simplement AR pour apelin receptor. Dans la suite de ce manuscrit, nous utiliserons la dénomination APJ. Le récepteur APJ a été identifié dans plusieurs espèces dont la souris, le rat, la vache, le macaque, le *Xenopus laevis* et le *Danio rerio* (O'Dowd et al., 1993). Les récepteurs de souris et de rat possèdent une homologie de séquence par rapport au récepteur humain de 91% et 89% respectivement, ce dernier étant plus long de trois acides aminés (Carpéné et al., 2007) (**Figure 3**). Il faut souligner qu'aucun sous-type du récepteur APJ n'a été découvert jusqu'à présent, bien que ça ne soit pas exclu (Katugampola et al., 2001).

RAT	MEDDG--YNYVGADNQSECDYADWTPSGALIPAIVILVFL	LOTTONGLVLWTVFWSSREK	58
MOUSE	MEDDG--YNYVGADNQSECDYADWKPSGALIPAIVMLVFL	LOTTONGLVLWTVFRTSREK	58
HUMAN	MEEGGDFDNYVGADNQSECEYTDWKSSGALIPAIVMLVFL	LOTTONGLVLWTVFRSSREK	60
	:.*	***:*****:****	
RAT	RRSADIFIASLAVADLTFVVTLPWATYTYREFDWPFQTF	SCKLSSYLIFVNMYSVFCL	118
MOUSE	RRSADIFIASLAVADLTFVVTLPWATYTYREFDWPFQTF	SCKLSSYLIFVNMYSVFCL	118
HUMAN	RRSADIFIASLAVADLTFVVTLPWATYTYRDYDWPFFQTF	FCKLSSYLIFVNMYSVFCL	120
	*****:*****	*****:****	
RAT	TGLSFDRYLAIVRPVANARLRLRVSGAVATAVLWVLAALL	AVPVMVFRSTDIPENSTKTQ	178
MOUSE	TGLSFDRYLAIVRPVANARLRLRVSGAVATAVLWVLAALL	AVPVMVFRSTDASENGTKIQ	178
HUMAN	TGLSFDRYLAIVRPVANARLRLRVSGAVATAVLWVLAALL	AMPVMVLRTTGDLNNTTKVQ	180
	*****:*****	*:****:*. ** **	
RAT	CYMDYSMVATSNSEWAWEVGLGVSTAVGFVVPFIIMLTC	YFFIAQTIAOHFRKERIEGL	238
MOUSE	CYMDYSMVATSNSEWAWEVGLGVSTAVGFVVPFIIMLTC	YFFIAQTIAOHFRKERIEGL	238
HUMAN	CYMDYSMVATSNSEWAWEVGLGVSTTVGFVVPFIIMLTC	YFFIAQTIAOHFRKERIEGL	240
	*****:*****	*****:*****	
RAT	RKRRRLLSIIIVLVVTFALCWMPYHLVKTLYMLGNLLHWP	CDFDLFLMNVPYCTCISYV	298
MOUSE	RKRRRLLSIIIVLVVTFALCWMPYHLVKTLYMLGSLHWP	CDFDLFLMNVPYCTCISYV	298
HUMAN	RKRRRLLSIIIVLVVTFALCWMPYHLVKTLYMLGSLHWP	CDFDLFLMNVPYCTCISYV	300
	*****:*****	*****:*****	
RAT	NSCLNPFLYAFFDPRFRQACTSMLCCDQSGCKGSPHSSSA	EKSASYSSGHSQGPQPNMCK	358
MOUSE	NSCLNPFLYAFFDPRFRQACTSMLCCDQSGCKGTPHSSSA	EKSASYSSGHSQGPQPNMGK	358
HUMAN	NSCLNPFLYAFFDPRFRQACTSMLCCGQSRCAGTSHSSSG	EKSASYSSGHSQGPQPNMCK	360
	*****:*****:*** **:	*****:*****	
RAT	GGEPMHKSIPYSQETLVD-		377
MOUSE	GGEQMHKSIPYSQETLVD-		377
HUMAN	GGEQMHKSIPYSQETLVVD		380
	*** *****		

Figure 3. Séquences en acides aminés des récepteurs de l'apéline (rat, souris et humain). Le récepteur de type humain fait 380 acides aminés, alors que ceux du rat et de la souris sont un peu plus courts (377 acides aminés). Les symboles suivants représentent: *, acides aminés identiques; :, mutation présente chez le rat ou la souris par rapport à l'humain; ., mutation présente chez l'humain (Pitkin et al., 2010a).

Pendant cinq ans, APJ a été un récepteur orphelin. C'est en 1998 que le groupe de Tatemoto a identifié le ligand endogène d'APJ (Tatemoto et al., 1998). Ce peptide, nommé apéline pour "*APJ endogenous ligand*" a été isolé à partir d'extraits d'estomac bovin. En effet, les auteurs ont évalué l'efficacité de différents tissus bovins et porcins à acidifier le milieu de culture de cellules CHO (Chinese hamster ovary) transfectées avec le récepteur APJ. Ce sont des extraits de *jejunum* bovins qui ont provoqué la plus forte acidification (le J de APJ provient d'ailleurs de *jejunum*). Après purification de ces tissus à l'aide de résines échangeuses de cations, la chromatographie en phase liquide (HPLC) a permis l'obtention de l'apéline. L'ADN complémentaire (cADN) a été synthétisé à partir de la séquence N-terminale de ce peptide, puis par des recherches dans des banques de données de gènes, les auteurs ont pu montrer une homologie de séquence codante pour une préproprotéine de 77 acides aminés chez l'humain, le rat et le bovin (Lee et al., 2000). Le gène codant pour la préproapéline est localisé sur le chromosome X dans le génome humain, l'homologie de séquence est de 82% entre le rat et l'humain (Carpéné et al., 2007).

2.2. Structures de l'apéline

La préproprotéine de 77 acides aminés de l'apéline est constituée d'une région N-terminale riche en résidus hydrophobes. Le premier site de clivage a été identifié au niveau du 22^{ème} acide aminé N-terminal entraînant la formation de la proapéline de 55 acides aminés (Castan-Laurell et al., 2012) (**Figure 4**). Ce fragment N-terminal semble constituer une séquence signal pour la sécrétion (Habata et al., 1999). Les précurseurs de la préproapéline de types bovin, rat, souris et humain partagent 76 à 95% d'homologie et semblent exister sous forme de dimères du fait de la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéine. Il a déjà été démontré pour d'autres protéines que cette dimérisation pourrait avoir un rôle protecteur contre des protéases intracellulaires (Lee et al., 2005). La proapéline est ensuite clivée au niveau de certains résidus basiques (arginine et lysine) conduisant aux quatre formes biologiquement actives de l'apéline: l'apéline-36, -17, -13. Une modification post traductionnelle de la glutamine en position N-terminale de l'apéline-13 mène au dérivé pyroglutaminé nommé Pyr¹-apéline-13 (**Figure 4**).

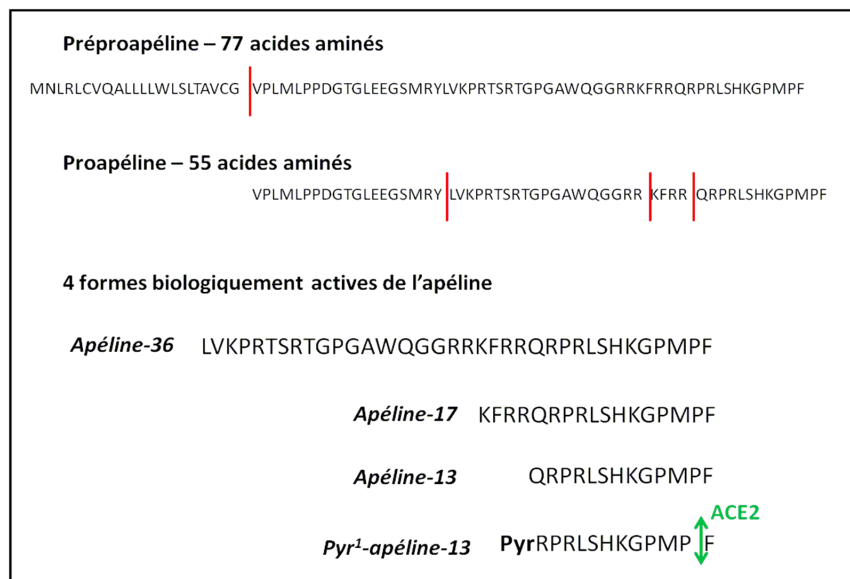


Figure 4. Maturation de l'apéline conduisant à ses différents isoformes chez le rat. La préproapéline constituée de 77 acides aminés est clivée entre la Gly²² et la Val²³ pour former la proapéline possédant 55 acides aminés. Il s'en suit des clivages entre des résidus basiques conduisant aux 4 isoformes biologiquement actives de l'apéline: l'apéline-36, -17, -13 et le dérivé acide pyroglutamique (Pyr¹-apéline-13). L'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE2) clive entre la Pro et la Phe C-terminale.

Cette modification est retrouvée sur d'autres peptides et constitue une stabilisation et une protection contre les dégradations par les protéases (Bowers et al., 2004). Etant donné l'absence de résidus cystéine au sein de ces quatre isoformes, il est fort probable que ces peptides soient présents uniquement sous forme monomérique. La séquence d'acides aminés de l'apéline-36 est plus conservée entre les espèces que celle de la préproapéline, avec une homologie variant de 86 à 100% entre le bœuf, le rat, la souris et l'humain. En revanche, les 23 acides aminés C-terminaux présentent 100% d'homologie entre les espèces suggérant un important rôle physiologique (Habata et al., 1999) (**Figure 5**).

Proapéline		
Bœuf	MNLRRCVQALLLLWLCLSAVCGGPLLQTSD	30
Homme	MNLRRCVQALLLLWLSLTAVCGGSLMPLPD	30
Rat	MNLSFCVQALLLLWLSLTAVCGVPLMLPPD	30
Souris	MNLRRCVQALLLLWLCLSAVCGGPLLQTSD	30
Bœuf	GKEMEETIRYLVQPRGPRSGPGP	54
Homme	GNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGP	54
Rat	GKGLEEGNMRYLVKPRTSRTGPGA	54
Souris	GTGLEEGNMRYLVKPRTSRTGPGA	54
Bœuf	WQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPP	77
Homme	WQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPP	77
Rat	WQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPP	77
Souris	WQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPP	77

Figure 5. Alignement des séquences de l'apéline chez le bœuf, l'humain, le rat et la souris. Les 23 acides aminés C-terminaux indiqués en rouge sont conservés entre les 4 espèces.

Les isoformes de l'apéline ont été détectées *in vivo* à différentes quantités selon les tissus. L'apéline-36 est retrouvée dans les poumons, les testicules et l'utérus chez le rat (Kawamata et al., 2001), tandis que la Pyr¹-apéline-13 est la forme prédominante au niveau du cœur chez l'humain (Maguire et al., 2009). Dans le plasma de rat et de souris, la Pyr¹-apéline-13 et l'apéline-17 sont les formes majoritaires, l'apéline-36 étant absente vraisemblablement du à une quantité importante dans le plasma de protéases responsables

du clivage entre les deux résidus basiques Arg⁶⁰ et Lys⁶¹. Dans le plasma humain provenant de sujets sains, la détection des différents isoformes de l'apéline a été possible via la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. En revanche, les faibles proportions retrouvées dans le plasma n'ont pas rendu possible la quantification (Mesmin et al., 2010). Depuis, une étude récente menée par Zhen et ses collaborateurs a permis d'améliorer la limite de détection, mettant ainsi en évidence que l'isoforme Pyr¹-apelin-13 est majoritaire dans le plasma humain à des concentrations allant de 7.7 à 23.3 pg/mL (Zhen et al., 2013).

Rainey et ses collaborateurs se sont penchés sur la structure adoptée par les isoformes de l'apéline avec une attention particulière sur l'apéline-17 (Langelaan et al., 2009). Par l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et du dichroïsme circulaire (CD), ce groupe a suggéré une absence de structure secondaire à 35°C ou 5°C. Cependant, au sein de l'apéline-17, les régions Arg⁶→Leu⁹ et Gly¹³→Phe¹⁷ seraient moins flexibles que le reste du peptide.

2.3. Dégradation de l'apéline

Avant notre étude (**voir article 2**), il y avait très peu d'information dans la littérature sur la dégradation de l'apéline. L'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2 (ACE2) a été identifiée en 2000 (Donoghue et al., 2000). Il s'agit d'une métalloprotéase principalement présente dans les cellules endothéliales vasculaires du cœur, dans le rein et les testicules. Cette enzyme convertit l'angiotensine I en angiotensine [1-9] et clive également l'angiotensine II entre la Pro et la Phe C-terminale pour former le dérivé à sept acides aminés angiotensine [1-7]. Quelques années après la découverte de cette enzyme, un groupe s'est intéressé à mettre différents ligands connus (dont l'apéline-13 et -36) en présence d'ACE2 pur. Vickers et ses collaborateurs ont ainsi observé un clivage par l'ACE2 des 2 isoformes de l'apéline étudiées entre la Pro et la Phe C-terminale (Vickers et al., 2002). Plus récemment, il a été mis en évidence que la Pyr¹-apéline-13 est clivée entre la Pro¹⁰ et la Met¹¹ dans le plasma humain, et aucune dégradation du fragment Pro¹²-Phe¹³ n'a été constatée (Zhen et al., 2013). Ceci soulève la question de la présence de l'ACE2 dans le plasma humain. En effet, cette enzyme est liée à la membrane et pourrait être physiquement

absente du plasma isolé (Guy et al., 2005). Une autre hypothèse serait que le traitement du sang (centrifugation) conduisant à l'obtention du plasma pourrait désactiver l'ACE2. Cette interrogation nous touche de près puisque nous nous sommes intéressés à découvrir plus avant le profil de dégradation de la Pyr¹-apéline-13 dans du plasma provenant de différentes espèces et également *in vivo* après administration par voie intraveineuse chez le rat (**voir article 2**).

2.4. Distribution tissulaire

2.4.1. Distribution du récepteur APJ

Chez l'humain, l'ARNm du récepteur APJ a été détecté et quantifié dans de nombreuses zones du système nerveux central par l'utilisation d'immunobuvardage de type "Northern" et de PCR quantitative. Le récepteur est présent à des niveaux élevés dans le noyau caudé, le corps calleux, l'hippocampe, l'amygdale, la substance noire, le noyau subthalamique, le bulbe rachidien, et la moelle épinière (Matsumoto et al., 1996; Edinger et al., 1998; Medhurst et al., 2003). L'expression d'APJ a également été observée dans le cortex cérébrale, et l'hypothalamus, la présence la plus forte étant localisée dans les neurones des noyaux paraventriculaire (PVN) et supraoptique (SON) de l'hypothalamus (Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000). Il est intéressant de souligner la colocalisation dans le PVN et le SON d'APJ avec les cellules exprimant l'arginine-vasopressine (AVP), justifiant ainsi le rôle du système apélinergique dans la régulation de l'équilibre hydrique (De Mota et al., 2004). Comme nous venons de le voir, le récepteur APJ est très largement distribué dans le système nerveux central, en revanche il y a encore des zones d'ombre concernant certaines de ses fonctions. Dans les tissus périphériques, l'ARNm du récepteur humain APJ a été le plus fortement détecté dans la rate et le placenta et à des niveaux plus faibles dans le poumon, l'estomac, le petit intestin et les ovaires (Edinger et al., 1998; Medhurst et al., 2003) (**Figure 6**). Des études d'immunohistochimie ont révélé la présence du récepteur APJ dans le système cardiovasculaire, au niveau des cardiomyocytes, des cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales (Kleinz and Davenport, 2005).

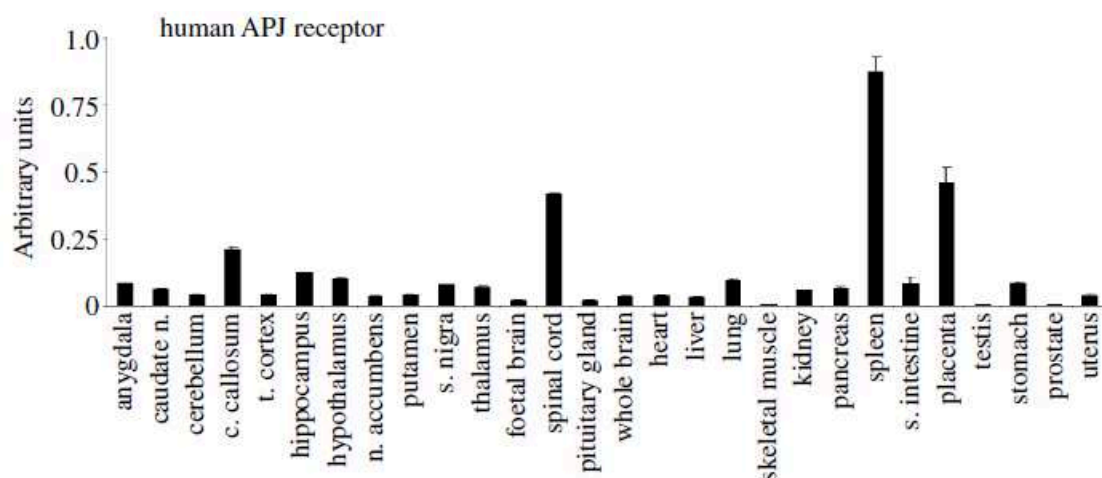


Figure 6. Distribution dans le système nerveux central et les tissus périphériques de l'ARNm du récepteur APJ humain. Le récepteur APJ humain possède une assez large distribution notamment dans le système nerveux central. Les niveaux les plus élevés de l'ARNm sont retrouvés dans la moelle épinière, la rate et le placenta (Medhurst et al., 2003).

Chez les rongeurs (rat, souris), la distribution du récepteur APJ est plus documentée que chez l'humain. Dans le cerveau, à l'aide des techniques d'immuno-buvardage de type "Northern", d'hybridation *in situ* et de PCR quantitative, de fortes proportions d'ARNm du récepteur APJ ont été retrouvées dans les noyaux PVN et SON de l'hypothalamus (De Mota et al., 2000; Hosoya et al., 2000; Lee et al., 2000; Medhurst et al., 2003). A l'instar de l'humain, il existe un important degré de colocalisation entre APJ et les cellules exprimant l'AVP (Reaux et al., 2001). Plus particulièrement chez la souris, les niveaux d'expression d'APJ sont inférieurs par rapport au rat dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le bulbe olfactif (Regard et al., 2008). En revanche, Pope et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence de plus importantes quantités d'ARNm d'APJ dans l'hypophyse antérieure et dans une moindre mesure dans l'hypophyse postérieure (Pope et al., 2012). L'hypophyse a une fonction d'agent de liaison entre le système nerveux et le système endocrinien en étant responsable entre autre de la régulation de la rétention d'eau par les reins. Cette localisation du récepteur de l'apéline est absente chez le rat amenant l'équipe de Pope à envisager un rôle particulier du système apélinergique chez la souris dans la fonction régulée par l'hypophyse. La distribution tissulaire d'APJ au niveau périphérique est sensiblement identique chez le rat et la souris. En effet, les niveaux les plus élevés d'ARNm sont

retrouvés dans le cœur, le poumon, les reins, les ovaires et l'utérus. La glande thyroïde, le muscle squelettique, la rate, le pancréas et le tissu adipeux présentent des quantités plus faibles d'ARNm du récepteur (Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Medhurst et al., 2003; Regard et al., 2008). Récemment, deux études ont permis de mettre en lumière des localisations inédites d'APJ chez la souris. Dans le système cardiovasculaire embryonnaire, l'ARNm semblerait prédominer dans les couches endothéliales des artères et des veines ainsi que dans la couche endocardique du cœur (Kang et al., 2013). La protéine correspondant au récepteur APJ a été d'autre part localisée dans les tissus hépatiques (Chu et al., 2013). Le **tableau 1** résume la distribution d'APJ dans le système nerveux central et dans les tissus périphériques.

2.4.2. Distribution de l'apéline

Chez l'humain, l'apéline comme son récepteur présente une large distribution dans le système nerveux central et les tissus périphériques. En 2000, une première cartographie des tissus exprimant l'apéline est publiée par Lee et ses collaborateurs démontrant que la préproapéline est retrouvée dans le thalamus, le noyau caudé, le cortex frontal, l'hypothalamus et l'hippocampe (Lee et al., 2000). Quelques années plus tard, une autre étude met en évidence des hauts niveaux d'expression dans la moelle épinière, le corps calleux, l'amygdale, la substance noire et la glande pituitaire (Medhurst et al., 2003). En périphérie, l'ARNm de l'apéline ainsi que le peptide lui-même sont retrouvés en fortes proportions dans le placenta et plus faiblement dans le cœur, le poumon et les reins.

	APJ			Apéline		
	Humain	Souris	Rat	Humain	Souris	Rat
Cerveau	+++	+	++	++	+++	+
Cervelet	+		+	+		+
Glande pituitaire		+	+	++	+	
Moelle épinière	+	++	+++	++		++
Glande surrénale			+			+
Thyroïde		+	+		+	+
Rate	+++	+			+	
Thymus	+	+				
Cœur	++	+++	++	++	++	++
Poumon	++	++	+++	+	++	+++
Estomac	+		+	+		
Intestin	++		+	++		+
Foie		+	+			
Prostate	+			+		
Ovaire	+	+	+		+	+
Utérus	+	+	+			+
Placenta	++		++	+++		
Glande mammaire			+			++
Muscle squelettique	+	++	++		+	+
Tissu adipeux			++			+
Cartilage			++			

Tableau 1. Distribution tissulaire de l'ARNm du récepteur APJ et de son ligand l'apéline chez l'humain, la souris et le rat. +++ indique un haut niveau, ++ un niveau moyen et + un faible niveau d'ARNm. Les cases vides indiquent que le récepteur ou le ligand n'a pas été détecté ou qu'aucune expérience n'a été menée pour cette localisation. Ce tableau compile les résultats provenant de (O'Dowd et al., 1993; Edinger et al., 1998; Devic et al., 1999; Lee et al., 2000; Medhurst et al., 2003).

La détection immunohistochimique de l'apéline est visible dans les cellules des tubules collecteurs du rein, dans les hépatocytes, les îlots pancréatiques et dans certaines fibres musculaires (De Falco et al., 2002). En revanche, l'apéline connaît une distribution plus restreinte dans le système cardiovasculaire en étant présente uniquement dans les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques (Kleinz and Davenport, 2004).

Chez les rongeurs, l'état des connaissances concernant la distribution de l'apéline est plus vaste pour le rat que pour la souris. Une étude de PCR quantitative sur l'expression de

la préproapéline chez la souris a révélé un fort signal dans le cerveau. Des signaux plus modérés à plus faibles furent observés dans le cœur, les reins, le poumon, les ovaires et la rate (Medhurst et al., 2003). Chez le rat, les travaux relatant la localisation de l'apéline sont plus conséquents. Au niveau central, l'ARNm de l'apéline possède une plus large distribution que celui de son récepteur. Par des expériences d'hybridation *in situ*, l'ARNm de la préproapéline a ainsi été détecté dans le cortex cérébral, les noyaux thalamiques, le claustrum (ou avant-mur) (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2002). Le transcrit de l'apéline est retrouvé dans le PVN et le SON et aussi au niveau d'autres neurones appartenant aux noyaux suprachiasmatiques. A l'instar du récepteur APJ, plusieurs études indiquent un important degré de colocalisation de l'apéline avec l'AVP (Brailoiu et al., 2002; De Mota et al., 2004; Reaux-Le Goazigo et al., 2004) mais également avec l'ocytocine (Brailoiu et al., 2002). Le groupe de Réaux-Le Goazigo s'est intéressé à la modulation par l'apéline de la relâche d'adrénocorticotrophine (ACTH), hormone dont le rôle est lié à la libération de glucocorticoïdes. L'utilisation d'expériences d'hybridation *in situ* combinées à de l'immunohistochimie a mis en lumière un haut niveau d'expression du système apélinergique dans les glandes pituitaires antérieures, principalement dans les cellules corticotropes et somatotropes, suggérant ainsi une interaction entre les deux systèmes (Reaux-Le Goazigo et al., 2007).

Dans les tissus périphériques, l'apéline possède une large distribution. Des hauts niveaux sont retrouvés dans le cœur, les ovaires, le tissu adipeux, les reins, la glande mammaire, l'intestin, le muscle squelettique, le testicule et l'utérus (Habata et al., 1999; Lee et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Kawamata et al., 2001). Durant la grossesse et la période de lactation chez le rat, Habata et ses collaborateurs ont observé une importante surexpression de l'ARNm de l'apéline atteignant les niveaux maximum lors de la parturition (Habata et al., 1999).

2.5. Rôles physiologiques et physiopathologiques

Depuis leur découverte, de nombreuses études ont mis en évidence les différents rôles du complexe apéline-APJ. Il apparaît comme un acteur majeur dans des fonctions physiologiques présentes à la fois au niveau central et périphérique. Ce chapitre va succinctement décrire les principaux rôles physiologiques et physiopathologiques de l'apéline et de son récepteur APJ.

2.5.1. Rôles sur le système cardiovasculaire

Ce domaine a été, de loin, le plus étudié dans la littérature, et est souvent considéré comme la principale cible du complexe apélinergique. En effet, c'est Lee et ses collaborateurs qui décrivent en premier en 2000 les effets de l'apéline sur le système vasculaire. Ils observent que l'injection par voie intraveineuse d'apéline-13 à des rats anesthésiés provoque une diminution rapide des pressions diastoliques et systoliques ainsi qu'une diminution du rythme cardiaque (Lee et al., 2000). Très rapidement, cet effet hypotenseur a été associé à un mécanisme dépendant de l'oxyde nitrique (NO), effet aboli chez les souris déficientes en APJ ou en présence de la L-NAME, un inhibiteur de l'oxyde nitric synthase (NOS) (Tatemoto et al., 2001; Ishida et al., 2004). Le NO, synthétisé par l'oxyde nitric synthase endothéliale (eNOS) à partir de la L-arginine, va activer la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) provoquant l'activation de certaines kinases qui vont favoriser la sortie de potassium et de calcium hors de la cellule. Il s'en suit une hyperpolarisation causant la relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux conduisant à un phénomène de vasodilatation associé à l'effet hypotenseur (Liu and Feng, 2012). De façon intéressante, des divergences sont apparues au cours des différentes études. En effet, une administration d'apéline-13 chez le rongeur peut provoquer soit une augmentation soit une diminution de la pression artérielle. Une controverse a ainsi émergé, ces résultats diamétralement opposés furent imputés à des différences de modèle animal, d'anesthésiant ou de voie d'administration (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001; Tatemoto et al., 2001; Cheng et al., 2003; Kagiya et al., 2005). Par la suite, une hypothèse a germé quant à l'importance de

l'intégrité de l'endothélium sur l'effet vasculaire de l'apéline. Si l'endothélium est normal, l'apéline aurait une action vasodilatatrice modulée par la relâche de NO, tandis qu'un endothélium endommagé conduirait à un effet vasoconstricteur (Katugampola et al., 2001; Cheng et al., 2003; Salcedo et al., 2007). Le groupe de Lee a découvert en 2005 que la substitution de la Phe¹³ de l'apéline-13 en Ala conduit à un analogue ne provoquant pas d'effet hypotenseur et de surcroît inhibant l'effet hypotenseur induit par l'apéline-13 native (Lee et al., 2005). Leur étude n'a cependant pas été poussée plus avant afin d'élucider quelles voies de signalisation seraient susceptibles d'être à la source de cet effet antagoniste. A date, cet analogue est le seul antagoniste physiologique interagissant avec APJ rapporté dans la littérature.

L'apéline a également un rôle sur la fonction cardiaque. Ses différentes formes sont parmi les agents inotropes positifs endogènes les plus puissants sur les tissus cardiaques avec des valeurs d'EC₅₀ allant de 40 à 125 pM sur un tissu humain (Maguire et al., 2009) et 33 pM sur un tissu de rat (Szokodi et al., 2002). De plus, l'apéline est un puissant facteur angiogénique (Cox et al., 2006) qui semblerait être impliqué dans la régulation du diamètre des vaisseaux sanguins durant l'angiogenèse (Kidoya et al., 2008). La **figure 7** rassemble les principaux effets du système apélinergique au niveau cardiovasculaire.

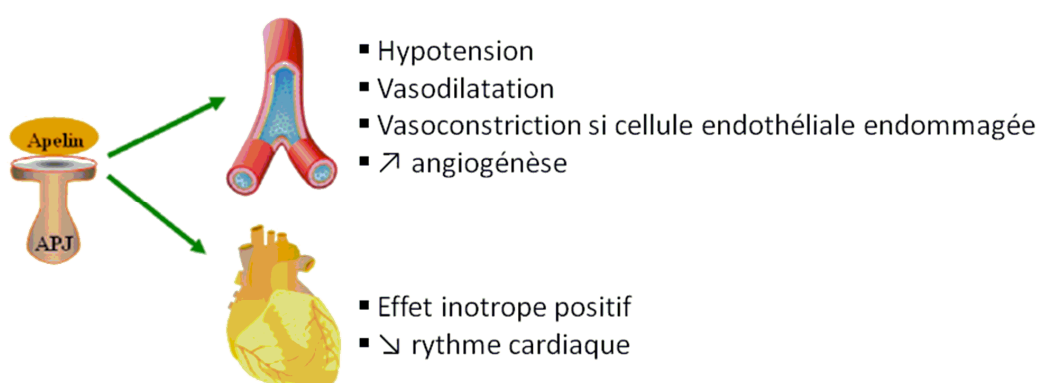


Figure 7. Les effets du complexe apéline-APJ sur le système cardiovasculaire (Yu et al., 2014).

L'apéline est impliquée dans de multiples pathologies liées au système cardiovasculaire telles que les désordres vasculaires, l'insuffisance cardiaque et l'ischémie. En phase précoce d'insuffisance cardiaque, les niveaux plasmatiques d'apéline sont supérieurs à la moyenne, puis tendent à se stabiliser lors de la progression de la pathologie (Chong et al., 2006; Miettinen et al., 2007). Atluri et ses collaborateurs ont observé, par des études d'immunobuvardage de type "Western" et d'immunohistochimie, qu'après provocation d'une cardiomyopathie ischémique chez le rat, les niveaux d'apéline et du récepteur APJ dans le cœur extrait étaient significativement augmentés (Atluri et al., 2007). Par la suite, d'autres groupes ont mis en lumière un potentiel rôle cardioprotecteur du complexe apélinergique en cas d'ischémie et d'hypoxie (Ronkainen et al., 2007; Sheikh et al., 2008; Zeng et al., 2009). Un lien semble exister également avec l'athérosclérose, maladie le plus souvent asymptomatique qui se caractérise par un épaississement anormalement élevé d'une plaque essentiellement composée de lipides (l'athérome) sur la paroi des artères pouvant conduire à l'obstruction de la circulation sanguine (Hopkins, 2013). Dans une artère coronaire atteinte d'athérosclérose, l'expression de l'apéline est grandement augmentée (Pitkin et al., 2010b). Son rôle demeure toutefois encore obscur puisque plusieurs études suggèrent, d'un côté une influence de l'apéline à favoriser le développement athérosclérotique, ou de l'autre un rôle contraire (Hashimoto et al., 2007; Chun et al., 2008). Plus récemment, un traitement par le dérivé pyroglutamique de l'apéline-13 sur un modèle de rats souffrant d'un infarctus du myocarde a conduit à une diminution nécrotique du myocarde ainsi qu'une diminution du rythme cardiaque accompagnée d'une action cardioprotectrice antioxydante sur le long terme (Azizi et al., 2013). Chez des rats mâles en situation de choc septique, l'apéline semble avoir une action inhibitrice sur l'insuffisance cardiaque mais aussi atténue la réponse inflammatoire, offrant ainsi une intéressante perspective thérapeutique dans le traitement du choc septique sévère (Pan et al., 2010). Au niveau clinique, l'administration par voie i.v. d'apéline-13 à des volontaires sains et à des patients souffrant de défaillance cardiaque provoque une vasodilatation coronaire et périphérique accompagnée par une diminution de la pression sanguine (Japp et al., 2008, 2010).

Rôle sur la régulation de l'équilibre hydrique

Des études d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont démontré que les ARNm de l'apéline et de son récepteur APJ sont exprimés en abondance dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans le SON et le PVN des neurones magnocellulaires ainsi que dans le noyau arqué (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001, 2002). L'AVP possède cette même localisation, cela a conduit plusieurs groupes à s'intéresser aux rôles du système apélinergique dans la régulation hydrique dont l'AVP est un acteur majeur (Reaux et al., 2001; O'Carroll and Lolait, 2003). Suite à l'injection i.c.v. à des souris, l'apéline inhibe la relâche d'AVP et diminue ses concentrations plasmatiques tout en augmentant la diurèse (De Mota et al., 2004). Chez des rats déshydratés, l'ARNm du récepteur APJ est fortement augmenté, et une administration d'apéline a des répercussions sur le comportement des animaux à s'abreuver, décrit par certains comme diminué (Reaux et al., 2001) et par d'autres comme inchangés par rapport aux animaux contrôles (Mitra et al., 2006). Cette intéressante différence expérimentale a été approfondie par le groupe de Kuba sur des souris invalidées pour le gène de l'apéline ('knock-out' (KO)). Dans leur étude, ces animaux KO déshydratés ont un comportement à s'abreuver comparable aux souris de type sauvage (Kuba et al., 2007). En revanche, chez des souris APJ KO privées d'eau, une urine hautement diluée est observée suggérant que le récepteur de l'apéline aurait un effet antidiurétique *in vivo* (Roberts et al., 2009). En somme, alors que l'administration d'apéline semblerait avoir un rôle diurétique, donc opposé à l'action de l'AVP, le récepteur APJ apparaît être important pour l'anti-diurésie, possiblement via une interaction avec le(s) récepteur(s) de l'AVP. Cette étonnante dichotomie reste encore obscure à ce jour. En plus de ses actions au niveau central, l'apéline a également des effets directs sur la microvascularisation du rein (Hus-Citharel et al., 2008).

2.5.2. Rôles au niveau central sur la douleur

Du fait de sa localisation au niveau central, nous nous sommes intéressés, dans ce projet, à l'implication de l'apéline dans la modulation de la douleur aiguë et tonique en testant les analogues apélinergiques les plus intéressants du point de vue de l'affinité et/ou de la signalisation. Cependant, seulement deux publications mettent en lien l'apéline et la

douleur. C'est le groupe de recherche du Professeur Chen qui a mis en évidence qu'après administration i.c.v. chez la souris, l'apéline-13 produit un effet analgésique dose dépendant dans le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude (douleur aiguë). L'analogue dont le résidu Phe¹³ a été substitué par une Ala, apéline-13 (F13A), décrit précédemment comme étant un antagoniste physiologique de l'effet hypotenseur de l'apéline-13 (Lee et al., 2005), ne provoque pas d'effet analgésique et bloque l'antinociception induite par l'apéline-13 (Xu et al., 2009). De plus, par l'utilisation d'antagonistes sélectifs pour chaque sous-type des récepteurs aux opioïdes, Xu et ses collaborateurs ont pu déterminer que la réponse analgésique de l'apéline-13 est abolie en présence d'un antagoniste sélectif du récepteur μ_1 , suggérant ainsi une implication de μ_1 dans la signalisation liée à APJ dans la modulation de la douleur aiguë. Ce lien entre l'apéline et les opioïdes n'est pas sans précédent. En effet, chez les souris rendues dépendantes à la morphine, les niveaux d'ARNm de l'apéline sont fortement réduits dans l'hypothalamus mettant ainsi en exergue un potentiel rôle de l'apéline dans la signalisation opioïdérique (Befort et al., 2008). La co-administration d'apéline-13 et de morphine mène à un effet analgésique supérieur à celui de la morphine seule dans le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude (Xu et al., 2009). Quelques années plus tard, une étude similaire a été conduite sur la douleur viscérale. Chez la souris, l'administration supraspinale par voie i.t. d'apéline-13 semble diminuer le nombre de crampes abdominales provenant d'une douleur viscérale consécutive à l'injection périphérique d'acide acétique. Un antagonisme par l'apéline-13 (F13A) et l'implication des récepteurs μ -opioïdes en lien avec le récepteur APJ dans la douleur viscérale ont été investigués et mis en évidence de la même façon (Lv et al., 2012). L'état des connaissances entre le système apélinergique et la modulation de la douleur est bien maigre à ce jour, et identifier une potentielle voie de signalisation responsable d'un effet analgésique représenterait une avancée conséquente.

2.5.3. Rôles au niveau de l'axe adipo-insulaire

L'insuline est un acteur primordial dans l'équilibre énergétique du métabolisme humain. Cette hormone peptidique, sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, permet le stockage et l'utilisation des substrats énergétiques tels que le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. Le phénomène de résistance à l'insuline se traduit

par une efficacité diminuée de cette dernière à permettre l'entrée du glucose dans les cellules afin d'y être métabolisé en énergie. De fait, les cellules deviennent sous-alimentées et le glucose s'accumule dans la circulation sanguine et lymphatique menant à une augmentation de la glycémie. La résistance à l'insuline est la caractéristique majeure du diabète de type 2 et est souvent reliée à l'obésité morbide (Kahn et al., 2006). Plusieurs études ont montré que l'apéline joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline (Boucher et al., 2005; Castan-Laurell et al., 2005) (**Figure 8**). Une administration par voie i.v. d'apéline-13 sur des souris insulino-résistante soumises à un régime riche en gras améliore sensiblement l'absorption du glucose par ces dernières (Dray et al., 2008). Une intolérance au glucose ainsi que des niveaux plasmatiques d'insuline considérablement augmentés ont été observés chez des souris apéline KO. Ceci est accompagné d'une quantité bien supérieure à la normale de tissus adipeux abdominal et épididymal, mettant ainsi clairement en évidence un rôle crucial de l'apéline dans l'homéostasie du glucose (Yue et al., 2010, 2011). L'apéline, sécrétée par les adipocytes, semble donc être un acteur important régulant l'activité du tissu adipeux.

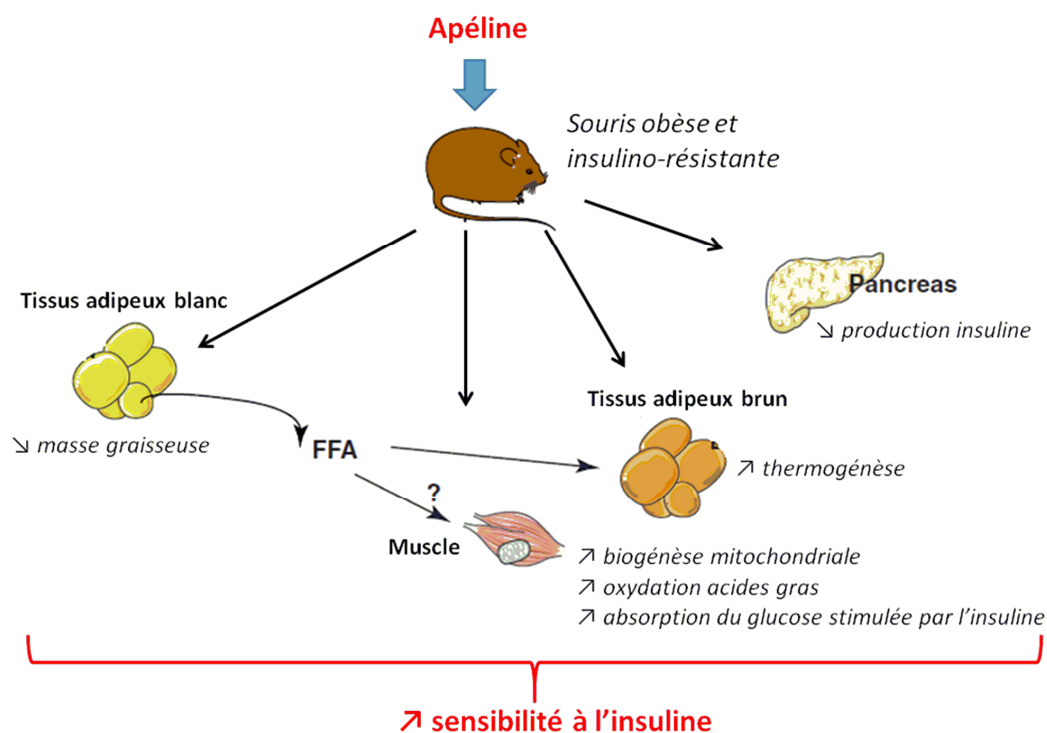


Figure 8. Les effets de l'apéline sur le métabolisme énergétique chez les souris obèses et insulino-résistantes. L'administration d'apéline cause une diminution de masse graisseuse du tissu adipeux blanc conduisant à la relâche d'acides gras libres (FFA) possiblement captés par le muscle pour leur oxydation. La biogenèse mitochondriale ainsi que le transport du glucose dans le muscle squelettique provoqués par l'insuline sont également augmentés. Les FFA agissent sur le tissu adipeux brun pour accroître la thermogénèse. L'apéline agit directement sur le pancréas menant à une diminution de production d'insuline. Tous ces événements combinés mènent à une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses et insulino-résistantes (Castan-Laurell et al., 2005).

Dans le tissu adipeux blanc, la résistance à l'insuline conduit à une augmentation des niveaux d'acides gras libres (FFA) qui vont être par la suite stockés dans le muscle squelettique ou le foie entraînant une diminution de la sensibilité à l'insuline par ces tissus (Boden, 2011). La lipolyse, qui consiste en l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et en glycérol, semble être également affectée par l'apéline. En effet, chez des souris apéline KO, les concentrations en acides gras libres et en glycérol sont significativement plus élevées que chez les animaux de type sauvage. De plus, l'administration d'apéline (pendant deux semaines) rétablit les niveaux d'acides gras libres et de glycérol (Yue et al., 2011). Force est de constater que ces phénomènes de lipolyse et de résistance à l'insuline sont intimement connectés. Il est par conséquent difficile de déterminer si l'action de l'apéline sur la sensibilité à l'insuline ne proviendrait pas en amont d'une action sur la lipolyse, ou inversement. Chez des patients obèses, hyper-insulinémiques, ou atteints du diabète de type 2, les concentrations plasmatiques d'apéline ont été observées comme étant significativement supérieures à la normale (Heinonen et al., 2005; Soriguer et al., 2009). Toutefois, ces niveaux peuvent être renversés comme cela a été le cas chez des patients ayant suivis un régime entraînant une perte de poids (Castan-Laurell et al., 2008).

2.5.4. Autres rôles

Outres les rôles physiologiques et physiopathologiques décrits ci-dessus, d'autres, moins étudiés dans la littérature, sont associés au complexe apélinergique. L'apéline a un rôle pro-prolifératif et suppresseur de l'apoptose dans les ostéoblastes (Xie et al., 2006, 2007; Tang et al., 2007). Le complexe apéline-APJ est exprimé dans plusieurs zones du tractus gastro-intestinal et aurait une influence lors de l'embryogenèse chez les rongeurs

(Wang et al., 2004, 2009; Susaki et al., 2005). De plus, la sécrétion de cholecystokinine, la prolifération des cellules gastriques et la régulation de la sécrétion de d'acide gastrique seraient également reliées au système apélinergique (Wang et al., 2004; Lambrecht et al., 2006; Ohno et al., 2012). Plusieurs études ont montré que l'apéline est un facteur angiogénique (Kasai et al., 2004; Kälin et al., 2007). Au niveau du foie chez la souris, la régénération des vaisseaux sanguins ainsi que des effets sur la régulation de leurs diamètres ont été mis en évidence lors de traitements par l'apéline (Eyries et al., 2008; Kidoya et al., 2010).

L'entrée du virus de l'immunodéficience chez l'humain (HIV-1) à l'intérieur des lymphocytes requiert une interaction entre l'enveloppe virale et le cluster de différenciation CD4. Plusieurs autres récepteurs sont également nécessaires à l'entrée du virus, comme CXCR4 et CCR5 qui sont les plus étudiés. Alors que l'apéline venait d'être découverte, APJ a été identifié comme un autre co-récepteur participant à l'entrée du virus HIV-1 dans la cellule (Choe et al., 1998; Edinger et al., 1998; Zhang et al., 1998). A cela s'ajoute le fait que les différents isoformes de l'apéline semblent bloquer l'entrée de HIV-1 (Zou et al., 2000), représentant ainsi une perspective thérapeutique très séduisante qui ne s'est malheureusement pas concrétisée puisqu'aucune étude de chimie médicinale autour de ce rôle n'a été décrite. Très récemment, un peptide nommé Toddler ou ELABELA, existant sous plusieurs isoformes, a été découvert et semble avoir un rôle crucial dans le développement embryonnaire humain via APJ (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). Le mode d'interaction du Toddler/ELABELA avec APJ ainsi que les voies de signalisation impliquées dans ce processus physiologique restent encore obscures. ELABELA est composé de 32 acides aminés, possède de nombreux résidus basiques (Arg, Lys), un pont disulfure en son centre. Le peptide est différent de l'apéline-13, des ressemblances émergent, à mes yeux, dans le fragment C-terminal. La possible existence d'un nouveau ligand endogène qui pourrait cibler APJ représente une avenue intéressante pour notre domaine de recherche.

2.6. Voies de signalisation

2.6.1. Signalisation dépendantes des protéines G

Lors de la découverte de l'apéline par Tatemoto et ses collaborateurs en 1998, les études préliminaires suggéraient que le récepteur APJ était couplé aux protéines $G\alpha_{i/o}$ (Tatemoto et al., 1998). En effet, les auteurs ont observé que l'apéline provoquait une diminution de la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'adénosine triphosphate (ATP) lors d'expériences où des cellules CHO exprimant APJ étaient stimulées par la forskoline, ce qui est une caractéristique fondamentale d'une association d'un récepteur aux protéines $G\alpha_{i/o}$ (Iyengar and Birnbaumer, 1982). La forskoline est un composé chimique extrait de la plante *Coleus forskohlii* permettant d'activer l'adénylate cyclase, enzyme membranaire produisant l'AMPc à partir d'ATP, sans passer par les récepteurs et les protéines G (Seamon and Daly, 1981). Cette observation faite par le groupe de Tatemoto a été confirmée un an plus tard, lors d'une étude utilisant des cellules CHO exprimant le récepteur humain APJ (hAPJ). Les premières puissances (EC_{50}) des différents isoformes de l'apéline sur cette voie de signalisation, qui est à ce jour la voie canonique d'APJ, ont ainsi été calculées. La Pyr^1 -apéline-13, l'apéline-13, -17 et -36 inhibent la formation d'AMPc stimulée par la forskoline de manière dose-dépendante à des EC_{50} de 0.17, 0.16, 0.28 et 0.52 nM respectivement avec pour tous ces analogues des efficacités maximales (Habata et al., 1999). De plus, l'idée d'un couplage unique à $G\alpha_{i/o}$ fut renforcée par l'incapacité de la Pyr^1 -apéline-13 et de l'apéline-36 à mobiliser l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule ainsi que la relâche d'acide arachidonique ou de ses métabolites, expériences faites sur les cellules CHO exprimant hAPJ. Deux études ultérieures ont cependant tempéré l'hypothèse de départ. Sur des neurones NT2N et des cellules HEK293 exprimant de façon stable hAPJ, l'apéline provoque une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire, suggérant à ces auteurs un couplage à $G\alpha_q$ (Choe et al., 2000; Zhou et al., 2003). En effet, l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} dans le cytosol de la cellule, suite à l'activation d'un RCPG, est généralement associée à un couplage du récepteur à la protéine $G\alpha_q$. Nous savons aujourd'hui que la signalisation d'un RCPG est bien plus complexe, et peut dépendre des sous-unités $G\beta\gamma$, du ligand introduit et du type cellulaire employé.

C'est le groupe de Hosoya en 2000 qui a démontré en premier un couplage clair à $G_{i/o}$. Par l'utilisation de la toxine pertussique (PTX), qui inhibe la sous-unité α des protéines $G_{i/o}$ en provoquant la ribosylation de l'ADP (Gilman, 1984; Ui et al., 1984), sur des cellules CHO-A10 exprimant hAPJ, les auteurs ont observé une suppression de l'acidification extracellulaire induite par la Pyr^1 -apéline-13 et l'apéline-36 (Hosoya et al., 2000). De plus, cet article présente la première étude d'affinité (IC_{50}) de l'apéline sur hAPJ. La synthèse du ligand radiomarqué à l'iode 125 a conduit à des modifications chimiques mineures qui seront conservées jusqu'à aujourd'hui. En effet, pour ioder le peptide, le résidu Phe C-terminal a été remplacé par un résidu Tyr. Puis, le résidu Met^{11} de la Pyr^1 -apéline-13 a été substitué par un résidu Nle (norleucine) afin d'éviter l'oxydation souvent associée à la présence d'un atome de soufre dans un peptide (Vogt, 1995). Le ligand [Pyr^1 , Nle^{11} , Tyr^{13}][^{125}I]apéline-13 a été mis en compétition avec la Pyr^1 -apéline-13 et l'apéline-36 sur les CHO-A10 citées plus tôt et a conduit à des IC_{50} de 1.4 et 4.8 nM respectivement. Enfin, Hosoya et ses collaborateurs ont mis en évidence une action chimiotactique des deux isoformes de l'apéline sur les CHO-A10 (Hosoya et al., 2000).

L'équipe de Masri a par la suite énormément contribué à l'avancée des connaissances concernant les effecteurs signalétiques d'APJ. Le traitement par l'apéline-13 sur des cellules CHO exprimant le récepteur APJ mène à une phosphorylation dépendante de Ras et PKC des protéines kinases p42 et p44, plus communément appelées ERK1/2, en fonction du temps avec une puissance évaluée par densitométrie à 50 nM. La réponse maximale est atteinte entre 5 et 10 minutes, puis diminue jusqu'à son abolition à 60 minutes. De façon intéressante, un traitement par la PTX empêche intégralement la phosphorylation des ERK1/2, suggérant une complète indépendance par rapport aux sous-unités $G\beta\gamma$. L'absence d'augmentation des niveaux d'inositol phosphate (IP) par l'apéline-13 amène le groupe de Masri (à ce moment là) à soutenir l'idée qu'APJ ne couple pas aux protéines $G_{q/11}$ (Masri et al., 2002). A nouveau, par le biais d'un couplage en amont à la protéine $G_{i/o}$, l'apéline-13 active la phosphorylation de la protéine kinase p70S6K dans les cellules CHO exprimant hAPJ et des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) par l'intermédiaire d'une cascade signalétique faisant intervenir les kinases PI3K, Akt et ERK (Masri et al., 2004). Deux études ultérieures, réalisées sur des cellules souches embryonnaires pluripotentes et des cellules endothéliales embryonnaires de souris, mettent

en avant un lien entre l'activation des kinases p70S6K, ERK1/2 et mTOR (Eyries et al., 2008; D'Aniello et al., 2009). Il existe trois isoformes de la protéine $G\alpha_i$, nommées $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ et $G\alpha_{i3}$. L'utilisation de cellules CHO exprimant des sous-unités α_i (une lignée par isoformes α_i) insensibles à la PTX a permis de mettre en exergue que l'apéline-13 et -36 induisent un couplage du récepteur APJ aux protéines $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$ et aucunement à $G\alpha_{i3}$ (Masri et al., 2006), la phosphorylation des ERK1/2 étant strictement dépendante de $G\alpha_{i2}$ (Bai et al., 2008). Cependant dans des ostéoblastes humains, l'apéline-13 n'active pas la voie des ERK1/2 et dans des neurones corticaux de souris exprimant de façon endogène APJ, le tridécapéptide semble même entraîner une diminution dose-dépendante de la phosphorylation des ERK1/2 (Xie et al., 2006; Zeng et al., 2010). Zeng et ses collaborateurs vont jusqu'à émettre l'hypothèse d'un rôle neuroprotecteur et anti-apoptotique de l'apéline, via la voie PI3K/Akt. Plusieurs groupes vont soutenir cette idée, dans des hippocampes de rats (O'Donnell et al., 2007) et dans des cellules vasculaires du muscle lisse chez le rat et l'humain (Cui et al., 2010; Liu et al., 2010). Un autre rôle majeur de l'apéline impliquant les protéines kinases PI3K/Akt est celui de la cardioprotection. L'administration d'apéline-13 dans la veine jugulaire, chez un modèle de souris dont l'artère coronaire antérieure a été ligaturé, amène à une réduction significative de l'infarctus (Simpkin et al., 2007).

L'apéline fait partie des agents inotropes positifs les plus puissants chez le rat et l'humain (Maguire et al., 2009). Cela a été très tôt démontré et relié à une activation de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC) et des échangeurs de cations Na^+/H^+ (NHE) et Na^+/Ca^{2+} (NCX) (Szokodi et al., 2002) (**Figure 9**). L'abrogation partielle de l'effet inotrope positif par la PTX ou par des inhibiteurs de la PLC et de la PKC amène l'équipe de Szokodi à suggérer que l'action d'APJ pourrait être dépendante d'un couplage aux protéines $G\alpha_{i/o}$ et/ou $G\alpha_{q/11}$, remettant ainsi sur le devant de la scène un hypothétique couplage aux protéines de la famille de $G\alpha_q$.

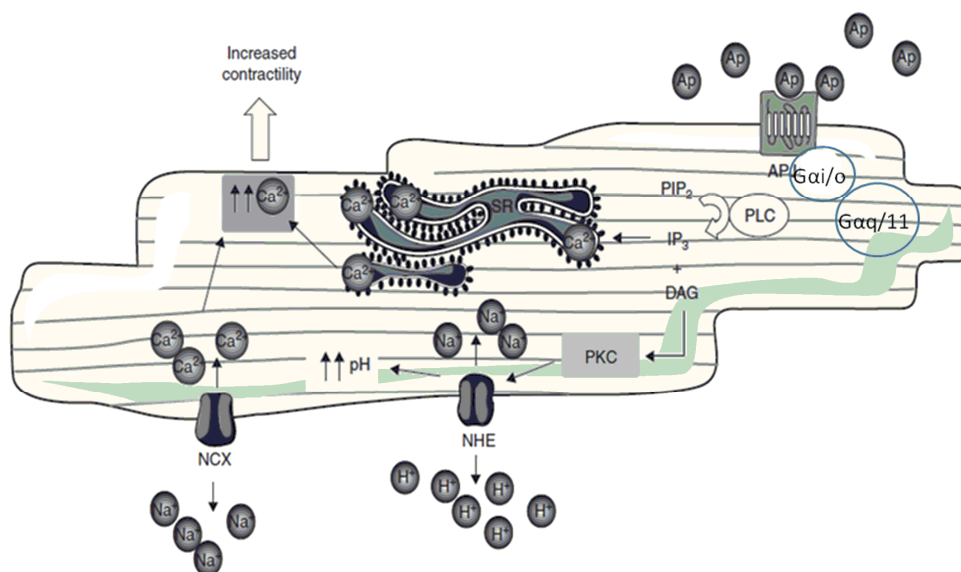


Figure 9. Signalisation intracellulaire responsable de l'effet inotrope positif de l'apéline. L'activation par l'apéline d'APJ entraîne un couplage aux protéines $G\alpha_{i/o}$ et/ou $G\alpha_{q/11}$ entraînant la formation d'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et de diacyl glycerol (DAG) obtenus suite à l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) par la PLC. DAG provoque l'activation de la PKC qui va être responsable de l'ouverture de l'échangeur Na^+/H^+ (NHE). D'autre part l' IP_3 , en se fixant sur ses récepteurs dans le réticulum sarcoplasmique, va conduire à une augmentation des concentrations en ions Ca^{2+} activant ainsi l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX). Cette forte augmentation des niveaux de Ca^{2+} se traduit par une augmentation de la contraction responsable de l'effet inotrope positif observé (Falcão-Pires et al., 2010).

Récemment, au niveau de l'axe adipo-insulaire sur une lignée cellulaire d'adipocytes 3T3-L1, l'apéline a montré une diminution des niveaux d'acides gras libres et de glycerol. Ce phénomène semble dépendant d'un couplage à $G\alpha_{i/o}$ et à la famille des $G\alpha_q$ du fait de son abrogation par la PTX et par un inhibiteur de la protéine $G\alpha_q$, la glycoprotéine 2A (Gp2A). De plus, cette inhibition de la lipolyse a été relié à deux mécanismes: une atténuation, médiée par la protéine kinase A (PKA), de la phosphorylation du résidu Ser^{563} de la lipase sensible aux hormones (HSL) ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la Ser^{565} de l'HSL médiée par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Yue et al., 2011). L'apéline peut conduire à un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur selon l'intégrité du tissu endothélial, dans les deux cas l'action aura lieu au niveau des cellules du muscle lisse qui expriment APJ. La vasodilatation fait intervenir l'activation d'APJ menant à la relâche d'oxyde nitrique (NO) par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) dépendant en

amont de la voie PI3K/Akt. Le NO va diffuser dans les cellules du muscle lisse produisant la vasodilatation. Un tissu endothélial endommagé va contourner la signalisation menant à NO pour directement faire intervenir APJ sur les cellules du muscle lisse. Le récepteur, vraisemblablement via un couplage à $G\alpha_q$ (bien que non démontré), va induire une entrée de Ca^{2+} intracellulaire par la voie classique IP_3 pour conduire à la vasoconstriction (Katugampola et al., 2001; Cheng et al., 2003; Salcedo et al., 2007) (**Figure 10**).

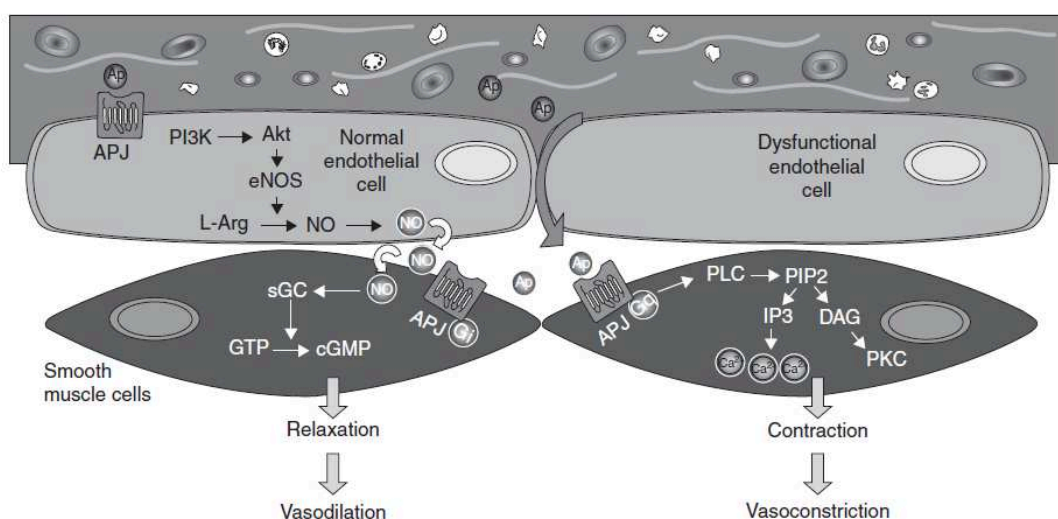


Figure 10. Signalisation intracellulaire responsable des effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs du complexe apéline-APJ. A gauche: une cellule endothéliale normale va conduire à un effet vasodilatateur de l'apéline par une signalisation d'APJ faisant intervenir PI3K/Akt, eNOS menant à la synthèse de NO nécessaire à la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) dans les cellules du muscle lisse. A droite: une cellule endothéliale endommagée va mener à un effet vasoconstricteur en contournant cette dernière. Le couplage d'APJ à $G\alpha_q$ va activer la cascade PLC, DAG et IP_3 provoquant l'augmentation des niveaux de Ca^{2+} dans la cellule du muscle lisse menant à la contraction (Falcão-Pires et al., 2010).

La voie du NO n'est pas seulement associé aux effets presseurs de l'apéline. En effet, un traitement par la Pyr^1 -apéline-13 post infarctus chez le rat augmente significativement les niveaux plasmatiques de NO suivi d'une réduction de la taille de l'infarctus (Azizi et al., 2013). Chez des souris diabétiques, l'activation de la eNOS par l'apéline semble être cruciale pour mener à une amélioration de la métabolisation du glucose. Cette observation a été validée par l'utilisation d'un inhibiteur de la NOS et d'une lignée de souris eNOS KO (Zhong et al., 2007; Duparc et al., 2011). Finalement, très peu

de travaux ont rapporté des possibles hétérodimérisations d'APJ avec d'autres RCPG. Par des études de co-immunoprécipitations et de transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET), APJ a été démontré comme pouvant dimériser avec le récepteur de l'angiotensine AT1 (Chun et al., 2008), avec le récepteur κ -opioïde (KOR) induisant une activation des ERK1/2 (Li et al., 2012), et plus récemment avec le récepteur de la neurotensine de type 1 (Bai et al., 2014).

En résumé, l'apéline active un large panel d'effecteurs intracellulaires dépendants en amont aux couplages du récepteur APJ aux protéines $G\alpha_{i/o}$ et à la famille des $G\alpha_q$. Les cibles finales de ces cascades signalétiques sont bien souvent des facteurs de transcription. La **figure 11** propose un résumé non exhaustif de ces voies de signalisation, dépendantes des protéines G, activées par APJ.

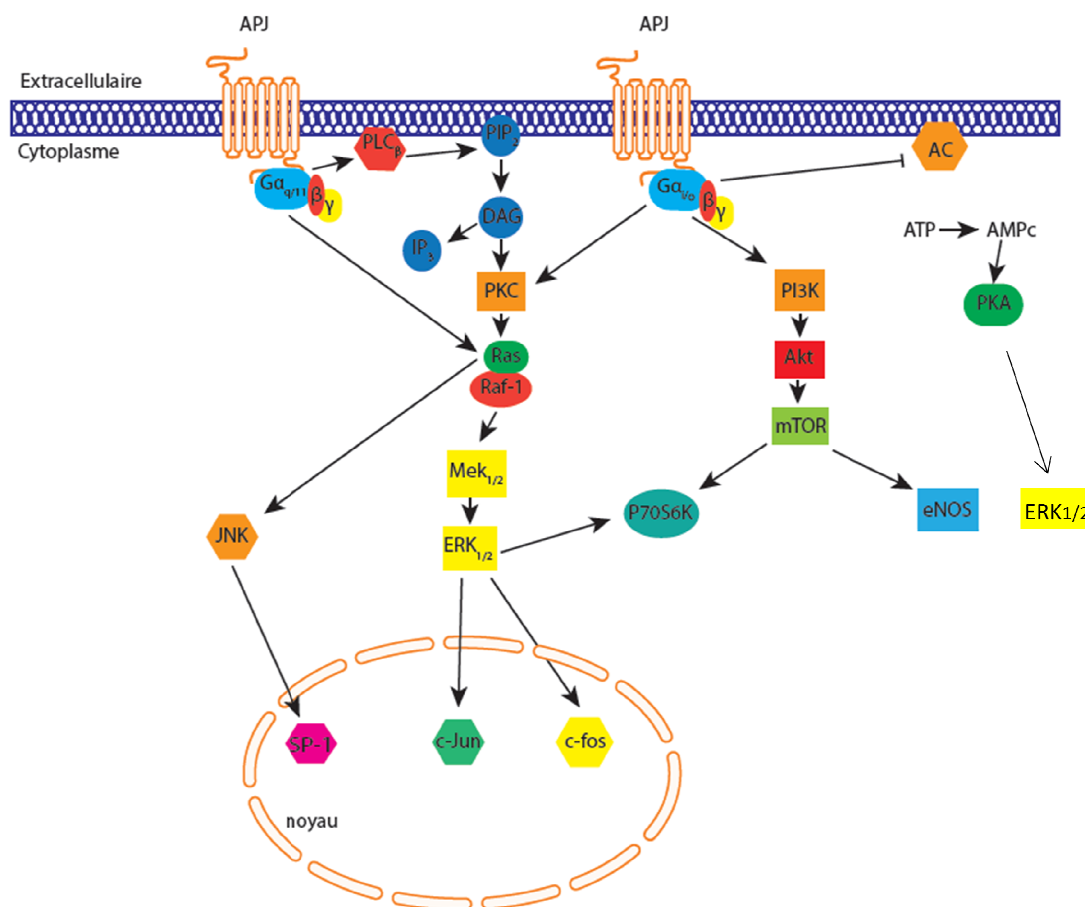


Figure 11. Représentation non exhaustive des voies de signalisation, dépendantes des protéines G, activées par APJ. Le récepteur APJ peut coupler à $G_{q/11}$ activant PLC_{β} . La cascade classique menant à l' IP_3 et DAG s'ensuit, ce dernier activant la PKC qui va activer la petite protéine G, Ras . Le facteur de transcription $SP-1$ dans le noyau est médié par l'intermédiaire de la kinase N-terminal de la $c-Jun$ (JNK). Ras va aussi induire $Raf-1$ menant aux $ERK1/2$ responsables des facteurs $c-Jun$ et $c-Fos$ ou de la kinase $p70S6K$. La voie canonique d'APJ est l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) diminuant ainsi la transformation ATP en $AMPc$ via un couplage à $G_{i/o}$. La PKA découlant de l' $AMPc$ va activer la phosphorylation des $ERK1/2$. D'autre part, $G_{i/o}$ peut aussi mener à $PI3K/Akt$ suivi de la kinase $mTOR$ entraînant la synthèse de NO par $eNOS$ ou l'activation de $p70S6K$.

2.6.2. Signalisation indépendante des protéines G

La signalisation d'un RCPG de façon indépendante aux protéines G est un concept bien plus récent que les voies classiques reliées aux protéines G. En effet ces 10 dernières années, la communauté scientifique a montré un intérêt grandissant dans ce paradigme signalétique et des efforts ont été déployés pour découvrir les rôles de cette signalisation

indépendante des protéines G sur la physiologie humaine. Les voies connues sont pour l'instant peu nombreuses, parmi elles l'activation de JAK-STAT. Il s'agit d'un système de transduction de signal extracellulaire une kinase «janus» et une protéine de type STAT (transduction de signal et activation de la transcription) (Aaronson and Horvath, 2002). D'autre part, le récepteur peut recourir à une transactivation de la petite protéine G Rho, membre de la famille des GTPase qui interagit par la suite entres autres avec RhoA (Boureux et al., 2007; Bustelo et al., 2007). Soulignons que la protéine Rho peut être activée également par $G\alpha_{12/13}$. De plus, le RCPG peut transactiver le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR). Ce dernier est situé à la surface de la cellule et va être activé en présence de ses ligands, le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) ou le facteur de croissance de transformation α ($TGF\alpha$), induisant une activation des MAPK, une homodimérisation ou une hétérodimérisation du récepteur (Herbst, 2004; Oda et al., 2005). Enfin, la voie indépendante des protéines G de loin la plus étudiée durant cette dernière décennie est celle des β -arrestines. Ces petites protéines ont quatre sous-types, cependant seules deux d'entres elles, appelées β -arrestine1 et β -arrestine2, sont ubiquitaires (les autres étant uniquement localisées dans l'œil) (Hirsch et al., 1999). Le rôle des arrestines est de désensibiliser le RCPG afin qu'il stoppe sa signalisation, il s'agit en quelque sorte d'un mécanisme d'arrêt. Cela nécessite l'intervention d'une classe de sérine/thréonine kinases, appelée les GRKs, qui vont phosphoryler le RCPG au niveau du carboxyle C-terminal et/ou de la boucle intracellulaire 3 (ICL3) (Ferguson et al., 1998; Dorn, 2009). De manière simplifiée, ce processus permet aux arrestines d'interagir avec le récepteur bloquant ainsi la signalisation dépendante des protéines G et provoquant son internalisation (DeWire et al., 2007). Par la suite, de nombreux effecteurs intracellulaires sont activés par les arrestines tels que les protéines Ras-1/Raf, les MAPK ou encore PI3K/Akt (Gurevich and Gurevich, 2004) (**Figure 12**). Il est intéressant de mentionner que dans de très rares cas, l'internalisation pourra avoir lieu indépendamment des β -arrestines (van Koppen and Jakobs, 2004). Par exemple, il a été mis en évidence que le récepteur aux leukotriènes B4 (BLT1) peut internaliser uniquement par le biais de la phosphorylation par GRK2 (Gaudreau et al., 2002). Enfin, le processus faisant suite à l'internalisation connaît plusieurs variantes. Le récepteur sera de "classe A" si celui-ci est rapidement recyclé à la surface

membranaire, ou de "classe B" si au contraire il est séquestré sur une plus longue durée puis dégradé dans un compartiment intracellulaire (Oakley et al., 2000; Evans et al., 2001).

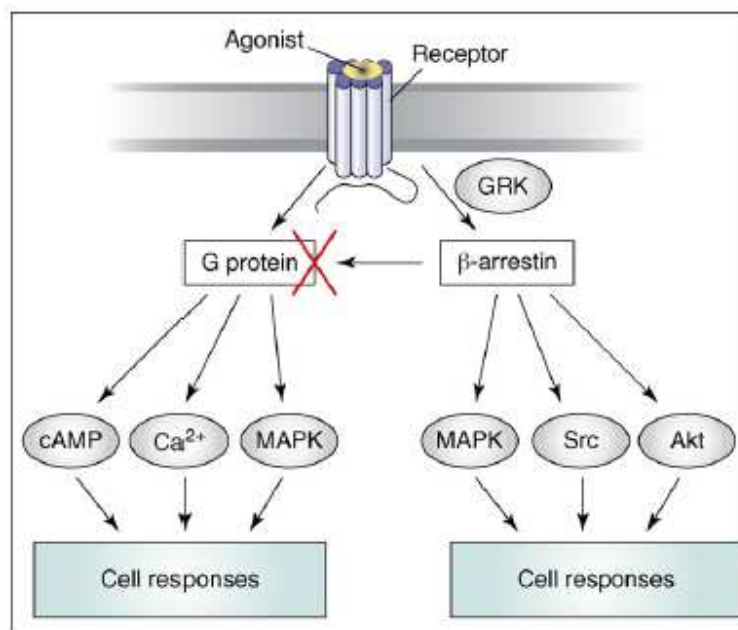


Figure 12. Représentation non-exhaustive des voies de signalisation dépendantes des β-arrestines. Un agoniste possédant une sélectivité fonctionnelle en faveur des β-arrestines va pouvoir activer de nombreuses voies de signalisation découlant du recrutement des β-arrestines telles que les kinases MAPK, Src ou encore Akt menant ainsi à différentes réponses cellulaires.

L'état des connaissances quant à la signalisation indépendante des protéines G pour le complexe apélinergique est maigre. L'internalisation du récepteur APJ via un recrutement des β-arrestines a été mis en évidence en 2001 (Evans et al., 2001). Le groupe de Lee, plusieurs années plus tard, a réalisé la première étude visant à déterminer les profils d'internalisation dépendants des β-arrestines selon l'isoforme du ligand endogène utilisé (Lee et al., 2010). En effet, à l'aide de la microscopie confocale, les auteurs ont démontré, lors de la stimulation par l'apéline-13, un recrutement de la β-arrestine1 par APJ puis une dissociation provoquant un recyclage rapide à la surface via un mécanisme dépendant de Rab4. Au contraire, l'apéline-36 va mener à une association de longue durée (> 2 heures) entre β-arrestine1 et APJ, ce dernier sera séquestré dans les endosomes puis dégradé selon un mécanisme dépendant de Rab7. En somme et de façon très intéressante pour notre domaine d'étude, il apparaît un biais vis-à-vis du profil d'internalisation d'APJ selon

l'isoforme de l'apéline utilisé. L'équipe de Lee n'a pas davantage investigué les voies de signalisation activées par les β -arrestines. Une étude plus récente a mis en exergue un rôle de l'apéline diminuant l'hypertrophie cardiaque induite par un étirement de type mécanique. La réponse signalétique induite par le phénomène d'étirement semble insensible à la PTX et indépendante des protéines G, de plus cet étirement semble diminuer la signalisation de l'apéline et augmenter le recrutement des β -arrestines. Mis ensemble cela suggère un rôle de l'apéline sur l'hypertrophie cardiaque dépendant des β -arrestines (Scimia et al., 2012).

3. La relation structure-fonction du système apéline-APJ

De nombreuses études ont mis en évidence les différents rôles physiologiques et physiopathologiques de l'apéline, cependant concernant l'aspect relation structure-fonction ou structure-activité (SAR), les données sont beaucoup plus restreintes. Ce domaine, à l'interface de la chimie et de la pharmacologie qui est qualifié de chimie médicinale ou encore de pharmacochimie, représente mon sujet d'intérêt et d'expertise dans ce projet. En conséquence, tout au long de ce chapitre, une attention particulière sera portée à la description des conclusions résultantes des différentes études de SAR pour le complexe apéline-APJ. C'est en 2003 qu'ont été publiés les premiers travaux s'intéressant à la SAR de l'apéline. Le groupe de Medhurst s'est penché sur le rôle de chaque acide aminé composant l'apéline-13 (Pyr¹-Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷-Lys⁸-Gly⁹-Pro¹⁰-Met¹¹-Pro¹²-Phe¹³) en réalisant un "alanine scan" (remplacement successif par une alanine de chaque acide aminé) (Medhurst et al., 2003). A noter que les résidus proline et la glycine n'ont pas été mutés car ces acides aminés sont structurants (Pace and Scholtz, 1998). Les auteurs ont jugé, à juste titre, que l'éventuelle perte pharmacodynamique engendrée par leurs mutations en alanine serait liée à un changement drastique de la conformation du peptide, ce dernier n'étant ainsi plus reconnu par le récepteur. Ces analogues alanine de l'apéline-13 ont été testés en radiolisation et sur les voies de signalisation AMPc et Ca²⁺ (**Tableau 2**). Medhurst et ses collaborateurs ont observé une perte d'affinité importante lors du remplacement de Arg², Arg⁴, Leu⁵ et Phe¹³, atteignant même 1.7 log pour Arg² et Leu⁵ mettant ainsi en évidence deux pharmacophores majeurs N- et C-terminaux au sein de l'apéline-13; le fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ et le résidu Phe¹³. Sur les voies de signalisation AMPc et Ca²⁺, les résultats suivent sensiblement la même logique qu'en radiolisation rendant ainsi plus complexe le lien

entre un acide aminé en particulier et l'engagement des voies AMPc ou Ca^{2+} . La substitution du résidu Lys^8 conduit à une perte plus légère des paramètres pharmacodynamiques. L'apéline-13, avec une fonction amide à la place d'un acide carboxylique en C-terminal, entraîne une diminution de l'affinité de plus de 1 log, mettant ainsi en exergue son importance pour l'interaction avec le récepteur. L'absence d'affinité des analogues tronqués en N-terminal souligne l'évidence du rôle central du fragment Arg^2 - Pro^3 - Arg^4 - Leu^5 dans l'apéline-13.

Peptide	Binding (HEK-293) $\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	cAMP (HEK-293) $\text{pEC}_{50} \pm \text{SEM}$	FLIPR (RBL) $\text{pEC}_{50} \pm \text{SEM}$
Apelin-36	8.61 ± 0.25	9.94 ± 0.53	7.72 ± 0.06
Apelin-17	9.02 ± 0.21	10.09 ± 0.16	7.94 ± 0.25
Apelin-13	8.79 ± 0.17	10.33 ± 0.34	7.65 ± 0.1
[<Glu1]apelin-13	8.88 ± 0.13	10.02 ± 0.28	7.70 ± 0.20
[Ala1]apelin-13	9.31 ± 0.05	11.83 ± 1.37	7.80 ± 0.27
[<Glu1,Ala2]apelin-13	7.12 ± 0.05	8.37 ± 0.58	7.29 ± 0.14
[<Glu1,Ala4]apelin-13	8.05 ± 0.01	9.00 ± 0.29	7.61 ± 0.09
[<Glu1,Ala5]apelin-13	7.15 ± 0.03	7.74 ± 0.26	6.73 ± 0.02
[<Glu1,Ala6]apelin-13	8.71 ± 0.07	9.84 ± 0.51	8.27 ± 0.09
[<Glu1,Ala7]apelin-13	9.31 ± 0.05	10.21 ± 0.56	8.78 ± 0.30
[<Glu1,Ala8]apelin-13	8.04 ± 0.02	9.21 ± 0.17	7.23 ± 0.15
[<Glu1,Ala11]apelin-13	8.64 ± 0.07	9.52 ± 0.3	8.33 ± 0.41
[<Glu1,Ala13]apelin-13	7.91 ± 0.10	9.63 ± 0.55	7.08 ± 0.19
[Glu1]apelin-13	7.82 ± 0.13	9.24 ± 0.29	7.33 ± 0.16
[<Glu1]apelin-13 amide	7.73 ± 0.28	9.52 ± 0.20	7.45 ± 0.17
[<Glu1,Met(O)11]apelin-13	8.53 ± 0.09	9.43 ± 0.23	7.16 ± 0.88
N-acetyl-apelin-13(8-13)	< 5	< 4.5	< 4.5
N-acetyl-apelin-13(5-13)	5.45 ± 0.24	5.88 ± 0.12	< 4.5

Tableau 2. Affinités et puissances sur les voies AMPc et Ca^{2+} de l'alanine scan de l'apéline-13 et de divers analogues. L'affinité pIC_{50} (déterminée par déplacement du radioligand [^3H]-[Pyr¹, Met(O)¹¹]apéline-13) et la puissance sur la voie AMPc pEC_{50} ont été mesurées sur des cellules HEK-293 exprimant de façon stable APJ, tandis que la puissance sur la voie calcique a été obtenue par un essai FLIPR (FLuorimetric Imaging Plate Reader) sur des cellules RBL-2H3-APJ. En jaune, les remplacements des résidus Arg^2 et Leu^5 par une alanine conduisent à d'importantes pertes sur les paramètres pharmacodynamiques étudiés mettant en évidence le rôle central du fragment Arg^2 - Pro^3 - Arg^4 - Leu^5 (Medhurst et al., 2003).

La même année, Fan et ses collaborateurs ont réalisé une étude similaire sur certains points à celle du groupe de Medhurst (Fan et al., 2003). Ces auteurs ont démontré à leur tour des pertes importantes d'affinité lors du remplacement par une alanine des résidus Arg^2 , Arg^4 , Leu^5 et Lys^8 dans l'apéline-13, cependant la substitution de la Phe^{13} ne semble entrainer aucune diminution notable contrastant ainsi avec les résultats de Medhurst. Ils se sont également intéressés à l'impact de ces analogues mutés sur l'augmentation des niveaux

de Ca^{2+} intracellulaire et leurs capacités à induire l'internalisation du récepteur APJ étiqueté avec une protéine fluorescente EGFP par microscopie confocale. À nouveau, des différences apparaissent notamment pour le résidu Phe^{13} qui, lorsqu'il est muté en alanine, ne semble provoquer aucune différence sur l'internalisation d'APJ-EGFP par rapport à l'apéline-13. Durant les années qui ont suivi, plusieurs études ont mis en évidence que les résultats du groupe de Fan étaient probablement erronés en ce qui concerne la Phe^{13} . Enfin, ces auteurs ont réalisé la première étude de dichroïsme circulaire (CD) dans l'eau, suggérant ainsi que l'apéline-13 et -36 ne possèderaient aucune structure secondaire et seraient désordonnées (Fan et al., 2003). Le premier antagoniste physiologique (et le seul décrit encore aujourd'hui) fut découvert deux années plus tard par Lee (faisant partie du groupe de O'Dowd ayant découvert le récepteur APJ). Ce furent les premiers à se pencher sur le rôle de la Phe^{13} C-terminale de l'apéline-13 (Lee et al., 2005). En effet, ces derniers ont utilisé des analogues offrant des substitutions du résidu Phe^{13} par la D-Phe, l'Ala, la D-Ala et aussi l'apéline-12 sans Phe C-terminale. Puis, sur des rats Wistar ou SHR mâles, après administration i.v. de ces peptides modifiés, les auteurs ont mis en évidence que les effets hypotenseurs de l'apéline-13 sont dépendants de l'acide aminé en C-terminal. En effet, l'absence du résidu Phe^{13} ou sa substitution par un résidu Ala ou D-Ala entraînent une réduction significative de la diminution de la pression artérielle moyenne (MABP) par rapport au peptide parent, tandis qu'avec la D-Phe l'hypotension reste inchangée (**Figure 13**). Le rôle crucial de la chaîne latérale aromatique de la Phe^{13} en ce qui concerne les effets hypotenseurs de l'apéline-13 semble de toute évidence se distinguer. L'apéline-13 (F13A) sera identifiée suite à cette étude comme un antagoniste physiologique d'APJ. Lors d'essais de douleur aiguë et viscérale réalisés chez la souris, l'apéline-13 a démontré des effets antinociceptifs. L'analogue F13A, lorsqu'administré par voie i.c.v., ne provoque aucune analgésie et semble également antagoniser les effets de l'apéline-13 (Xu et al., 2009; Lv et al., 2012). D'un point de vue signalétique, ces récents résultats ouvrent une avenue intéressante quant à la détermination de l'effecteur intracellulaire qui serait biaisé, et éventuellement responsable de l'hypotension et de l'analgésie associées à l'apéline-13.

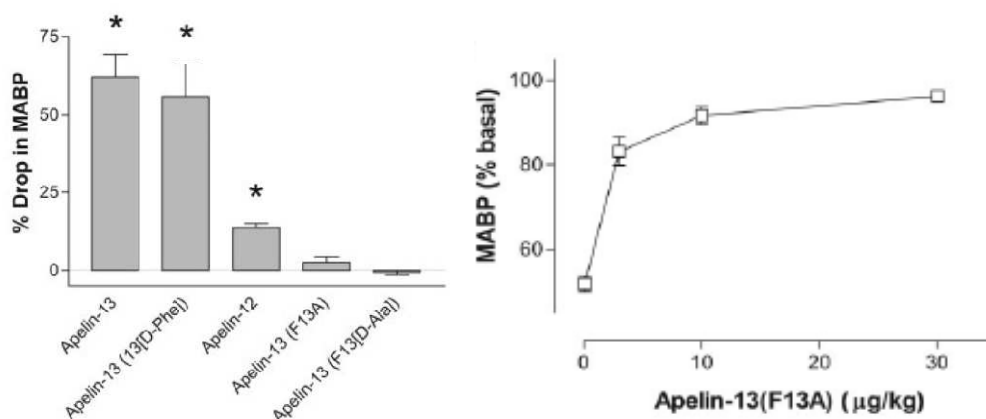


Figure 13. Diminutions maximales par rapport au niveau basal des pressions artérielles moyennes (MABP) induites par les différents analogues de l'apéline-13 dont la Phe¹³ est modifiée et effet antagoniste de l'analogue F13A chez les rats Wistar ou SHR mâles. Gauche: L'apéline-12 sans Phe¹³ et les modifications F13A et F13(D-Ala) mènent à une chute significative de la diminution de MABP par rapport au ligand naturel, tandis que l'analogue apéline-13(F13(D-Phe)) ne provoque aucune perte des effets hypotenseurs par rapport à l'apéline-13. *, $P < 0.0001$ vs. apéline-13(F13A). Droite: L'analogue F13A antagonise de façon dose-dépendante l'effet hypotenseur induit par une administration i.v. de 15 μg/kg d'apéline-13 (Lee et al., 2005).

Les premiers analogues macrocycliques de l'apéline sont apparus en 2008. A partir de l'apéline-12 sans résidu Pyr¹ en N-terminal, trois dérivés cycliques ont été rapportés (**Figure 14**). Ces composés ont été testés sur les voies de signalisation AMPc, Akt et ERK1/2. Par rapport au ligand naturel, les trois peptides cycliques se sont montrés beaucoup moins puissants sur les voies étudiées avec des pertes supérieures à un facteur 100. Entre eux, aucun ne se démarque clairement, rendant ainsi difficile de conclure quant à l'importance de chaque fragment N- et C-terminal de l'apéline-13 pour l'activation des voies AMPc, ERK1/2 et Akt. En revanche, par des études d'immunobuvardage de type "Western" sur des HEK293 transfectées avec le récepteur APJ, les trois voies ont été reliées à l'activation en amont des protéines $G\alpha_{i/o}$ puisque les voies AMPc, Akt et ERK1/2 sont abrogées en présence de PTX (Hamada et al., 2008). Sachant qu'Akt et ERK1/2 peuvent également être activées par la voie des β -arrestines (Reiter et al., 2012), cette information s'avère tout à fait intéressante dans une optique d'élaboration de ligands biaisant ces voies de signalisation. Toutefois, ces conclusions sont à mettre en relief, en effet la signalisation pouvant être dépendante du type cellulaire.

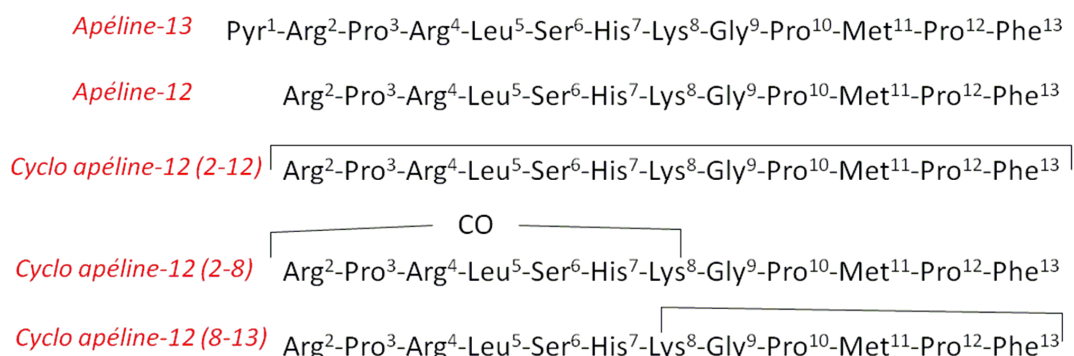


Figure 14. Structures de l'apéline-13, -12 et des dérivés cycliques. L'apéline-12 correspond ici à l'isoforme à 13 acides aminés sans le résidu Pyr¹. Le cyclo apéline-12 (2-12) est un peptide cyclique tête-à-queue avec un pont amide, le cyclo apéline-12 (2-8) a une cyclourée, avec un lien urée entre le résidu Arg² et la chaîne latérale du résidu Lys⁸, et le cyclo apéline-12 (8-13) a un cycle entre la chaîne latérale de la Lys⁸ et la fonction acide carboxylique du résidu Phe¹³ pour former un pont amide.

Dans un registre plus structural, les travaux menés par Langelaan et ses collaborateurs ont énormément contribué à l'avancement des connaissances et de la compréhension concernant la structure adoptée par l'apéline en solution. En 2009, par le biais d'études de dichroïsme circulaire (CD) et par résonance magnétique nucléaire (RMN), des ensembles de structures de l'apéline-17 dans l'eau ont été calculé (en conservant pour les analyses les 80 conformations d'énergie les plus basses) et ont suggéré l'existence de deux régions très structurées, le reste du peptide étant beaucoup plus désordonné (**Figure 15**). L'un de ces fragments correspondrait à l'épitope N-terminal de l'apéline-13, Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵, précédemment décrit comme un pharmacophore au rôle crucial lors de l'interaction avec le récepteur APJ. Cette observation, réalisée en solution à l'aide d'un outil de mesure physique, conforte considérablement ce que les précédentes études avaient mis en évidence. De plus, les résultats du groupe de Rainey suggèrent que ce fragment ferait un β -turn de type IV, tandis que la queue C-terminale de l'apéline-17 convergerait, en baissant la température de l'expérience de 35°C à 5°C, vers une structure de type polyproline II (Langelaan et al., 2009).

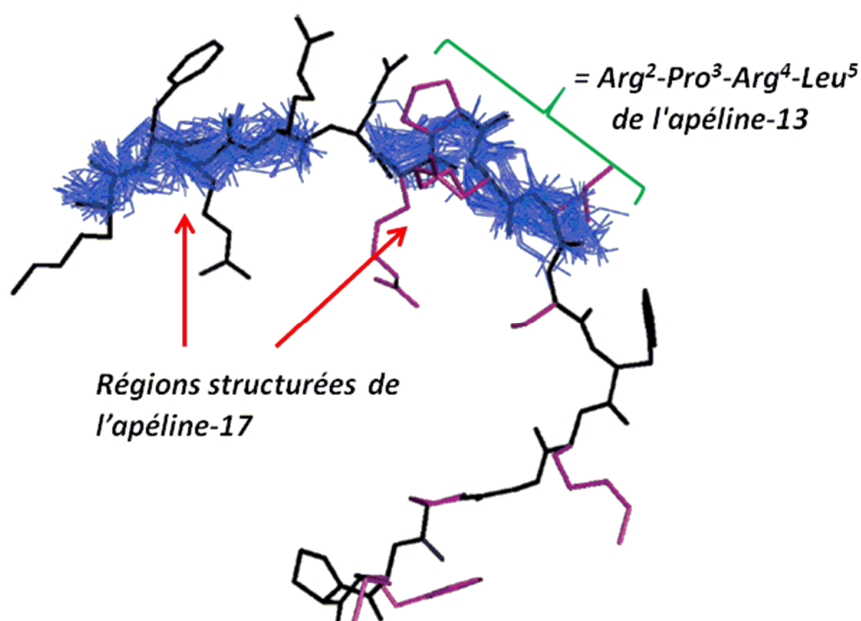


Figure 15. Ensemble de structures de l'apéline-17 dans l'eau, déterminées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, présentant les régions les plus structurées. L'apéline-17 semble posséder deux régions très structurées (en bleu), le reste du peptide étant désordonné. Une des régions correspond au pharmacophore Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ de l'apéline-13 précédemment désigné comme étant crucial pour l'interaction avec le récepteur APJ, ce fragment semblerait faire un β -turn de type IV. Cet ensemble de structures correspond aux 80 conformations d'énergie les plus basses (en partant de 200 conformations) obtenu à 35°C dans l'eau (modifié de Langelaan et al., 2009).

La catalyse membranaire est une hypothèse selon laquelle un ligand peptidique activerait son récepteur cible après une interaction initiale avec la membrane cellulaire environnante. Le ligand serait alors structuré par cette dernière afin d'adopter la conformation favorisant, d'un point de vue énergétique, la liaison et l'activation de son récepteur (Langelaan and Rainey, 2010). En effet cette hypothèse, initialement imaginée par Sargent et Schwyzer, s'appuie principalement sur le fait qu'un peptide interagirait préférentiellement avec la bicouche lipidique plutôt qu'avec le récepteur lui-même du fait de sa petite taille en comparaison à la bicouche (Sargent and Schwyzer, 1986). Langelaan et Rainey se sont intéressés de près à cette théorie et ont réalisé des investigations mettant en compétition les interactions qu'aurait l'apéline-17 avec des micelles, servant de mimétiques de membranes, de type anioniques ou zwitterioniques (par l'utilisation de différents détergents). Il apparaît que le peptide se lierait bien plus favorablement avec les micelles anioniques, qui sont structurellement proches de la bicouche lipidique (chargée

négativement) contrairement aux zwitterioniques, suggérant une interaction de l'apéline-17 avec le récepteur APJ via un mécanisme faisant intervenir au préalable une catalyse membranaire (Langelaan and Rainey, 2009). Lors de cette étude, de nouvelles analyses de l'apéline-17 par spectroscopie RMN, à l'aide d'agents paramagnétiques, ont permis de raffiner les connaissances structurales du pharmacophore situé en N-terminal. Le fragment Arg⁶→Leu⁹ (correspond pour l'apéline-13 à Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵) tendrait vers un β -turn de type I, celui de type IV serait en fait initié par la chaîne latérale hydroxyle du résidu Ser¹⁰ adjacent (Langelaan and Rainey, 2009). Cette nouvelle implication structurale de la sérine a également été mise en avant par Macaluso et Glen lors d'une étude faisant intervenir des analogues cycliques tête-à-queue de la partie N-terminale de l'apéline-13: cyclo(1-6), (1-7), (1-8) et (1-9). La modélisation moléculaire a permis l'extraction des angles dièdres Ψ et Φ des conformations de plus basses énergie. Lorsque positionnés sur un diagramme de Ramachandran, les auteurs ont ainsi pu suggérer la présence d'un β -turn au sein du fragment Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷. Cela serait favorisé par la liaison hydrogène que ferait l'hydroxyle de la Ser⁶ de l'apéline-13 avec le carbonyle de la Leu⁵ (Macaluso and Glen, 2010). Ces conclusions, à prendre avec réserve puisqu'ils résultent de la modélisation, contrastent légèrement avec ceux du groupe de Rainey. Toutefois, il en ressort une implication de la chaîne latérale du résidu Ser⁶ dans un β -turn localisé au niveau de l'épitope N-terminal de l'apéline-13, Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵, au rôle pharmacophorique essentiel.

Ces dernières années, le rôle pivot, d'un point de vue physiologique, du résidu Phe¹³ a fait l'objet d'un intérêt grandissant. Plusieurs groupes se sont penchés sur son impact signalétique, et notamment sur la compréhension des interactions que pourraient avoir ce résidu avec le récepteur APJ. Des études de microscopie confocale ont permis de démontrer que l'internalisation du récepteur APJ, étiqueté avec une protéine fluorescente EGFP, est diminuée de moitié en présence de l'analogue apéline-17 (F17A), et complètement abrogée avec l'apéline-16 sans le résidu Phe C-terminal. Etant donné le caractère antagoniste physiologique associé à l'analogue apéline-13 (F13A), il semble raisonnable d'imaginer un lien entre l'internalisation du récepteur APJ et l'absence d'effets hypotenseurs ou analgésiques, corrélation qui n'a pour l'instant pas été investiguée plus avant. Le groupe d'Iturrioz a été le premier à proposer un modèle moléculaire d'arrimage de l'apéline-13 ou -

17 avec le récepteur humain APJ (Iturrioz et al., 2010a). D'après ce modèle fait par homologie avec le récepteur cholecystokinine-1 (CCKR-1), le résidu Phe C-terminal interagirait avec trois acides aminés aromatiques dans la poche de liaison: le résidu Trp¹⁵⁴ présent dans le domaine transmembranaire 4 (TM^{IV}), le résidu Phe²⁵⁷ (TM^{VI}) et le résidu Trp²⁶¹ (TM^{VI}) (**Figure 16**).

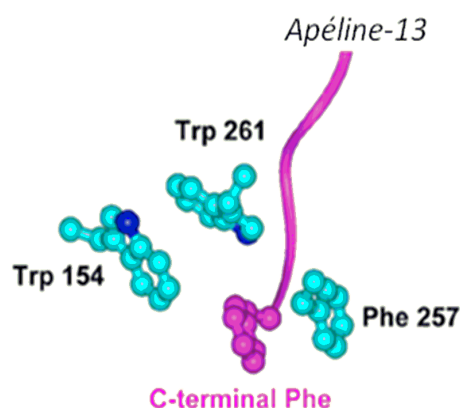


Figure 16. Modélisation moléculaire de l'arrimage de l'apéline-13 ou -17 dans le récepteur humain APJ: Interactions de la Phe C-terminale. Ce modèle est obtenu par homologie avec le récepteur cholecystokinine-1 (CCKR-1), le programme utilisé est NAMD. En bleu clair sont représentés les 3 résidus aromatiques (Trp¹⁵⁴, Phe²⁵⁷ et Trp²⁶¹) du récepteur qui seraient à distance d'interaction de la Phe C-terminale, le peptide étant indiqué en rose. Cette vue fixe est une moyenne des simulations de 20 ns qui ont été enregistrées après un raffinement énergétique et une équilibration de la dynamique moléculaire (Iturrioz et al., 2010a).

Afin de déterminer les rôles de ces résidus, les auteurs ont réalisé de la mutagenèse dirigée et ont généré des récepteurs dont les trois acides aminés cités ci-dessus ont été mutés en Ala, Phe ou Trp. Des essais de radioliation et d'internalisation ont mis en évidence que la mutation des résidus Phe²⁵⁷ ou Trp¹⁵⁴ en Ala est délétère pour la liaison de l'apéline-17 et pour l'internalisation de ces récepteurs mutants, tandis que la mutation du Trp²⁶¹ n'empêche pas la liaison mais uniquement l'internalisation. Il est intéressant de noter que le rôle central du résidu Trp¹⁵⁴ (TM^{IV}) n'est pas sans précédent. En effet, chez d'autres RCPG de classe A, cet acide aminé a été décrit comme étant primordial pour le maintien de l'intégrité structurale du récepteur (Wess et al., 1993; Befort et al., 1996; Rhee et al., 2000). Il en ressort que des interactions de type π -stacking, que pourrait faire le résidu Phe C-

terminal de l'apéline-13 ou -17 avec certains résidus aromatiques du récepteur, seraient importantes pour l'affinité et essentielles pour l'internalisation d'APJ. Cependant, comme cela a été mentionné un peu plus haut, les conclusions tirées suite à des travaux de modélisation moléculaire sont toujours à prendre avec beaucoup de recul, d'autant plus que le récepteur CCKR-1 a un taux d'homologie avec APJ qui est inconnu (contrairement à AT1R par exemple). Une très récente étude de modélisation réalisée par ce même groupe, cette fois-ci faite par homologie avec le récepteur CXCR4 (possédant un fort taux d'homologie avec AT1R) suggère que les résidus Arg², Arg⁴ et Lys⁸ de l'apéline-13 interagiraient avec les résidus Glu¹⁷⁴, Asp²⁸⁴ et Asp⁹⁴ du récepteur APJ (Gerbier et al., 2015).

Les criblages à haut débit ou "High Throughput Screening" (HTS), ont connu un important essor à partir des années 2000. Le premier ligand non peptidique du récepteur APJ a été découvert lors d'un HTS réalisé sur une bibliothèque de 800 composés fluorescents. L'objectif était d'identifier des molécules qui réduiraient l'émission de fluorescence des cellules HEK-293 exprimant de façon stable le récepteur hAPJ étiqueté avec une protéine fluorescente EGFP, diminution observée par Förster Resonance Energy Transfer (FRET), la molécule E339-3D6 a ainsi été découverte (**Figure 17**). Elle est composée d'un fragment tri-cationique peptidomimétique séparé par un long espaceur aliphatique d'un fragment polyaromatique fluorophore (la lissamine). Cette molécule possède une affinité de 430 nM, ce qui représente tout de même une perte d'un facteur 100 environ par rapport à l'apéline-13 qui a un IC₅₀ de l'ordre du nM. Les auteurs se sont également penchés sur la capacité du E339-3D6 à inhiber la formation d'AMPC à partir d'ATP après stimulation par la forskoline ainsi que l'internalisation du récepteur hAPJ-EGFP (par microscopie confocale). E339-3D6 apparaît comme un agoniste partiel sur la voie AMPc avec un EC₅₀ de 640 nM (l'apéline-13 étant à nouveau de l'ordre du nM) et une efficacité de 60%. La molécule provoque également l'internalisation du récepteur mais à des concentrations 100 à 1000 fois plus élevées que celles requises par l'apéline-17. Par des essais sur des aortes de rats isolés, les effets vasodilatateurs de E339-3D6 semblent proches de l'apéline-17. Iturrioz et ses collaborateurs ont à nouveau réalisé une étude de modélisation moléculaire. Leurs résultats suggèrent que le fragment tri-cationique interagirait avec l'Asp¹⁸⁴ et l'Asp²⁸² alors que le groupement polyaromatique serait entouré

par 5 résidus aromatiques de la poche C-terminale du récepteur hAPJ (Iturrioz et al., 2010b). Cependant, ce modèle étant le même que celui présenté plus haut (homologie avec CCKR-1), les conclusions tirées par cette nouvelle étude sont à prendre, encore une fois, avec du recul. L'analyse structurale du E339-3D6 met en évidence que le fragment tri-cationique serait vraisemblablement un mimétique de l'épitope N-terminal de l'apéline-13 (Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵) et la lissamine polyaromatique symboliserait quant à elle l'épitope C-terminal. La grande flexibilité de l'espaceur aliphatique séparant ces deux importants pharmacophores permettrait de convenablement les positionner dans leurs poches de liaisons respectives. Le modèle moléculaire du groupe d'Iturrioz suggère que les deux résidus Arg (chargés positivement) feraient des ponts salins très forts avec des résidus du récepteur chargés négativement, le résidu Phe C-terminal se positionnerait ensuite plus profondément au cœur des domaines transmembranaires du récepteur APJ, faisant ainsi des interactions de type π -stacking avec des résidus aromatiques. Très récemment, une étude de SAR autour du composé E339-3D6 a été menée. Diverses modifications chimiques des trois fragments cationiques, de l'espaceur aliphatique et du groupement fluorophore ont permis d'identifier les déterminants structuraux du composé nécessaires au maintien de l'affinité, de la capacité à activer la voie AMPc et à l'internalisation d'APJ. Cela a également conduit à la découverte de 3 analogues du E339-3D6 présentant des paramètres pharmacodynamiques et des stabilités plasmatiques *in vitro* accrus (Margathe et al., 2014).

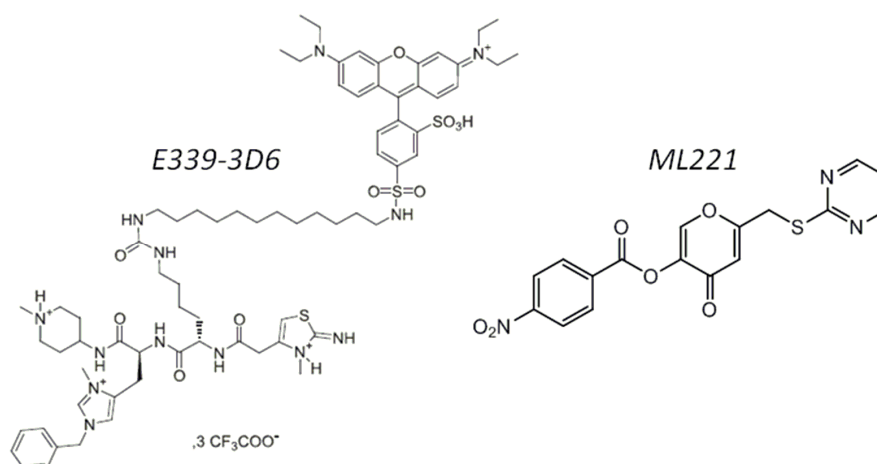


Figure 17. Structures chimiques du E339-3D6 (gauche) et du ML221 (droite). Ces deux molécules ont été découvertes lors d'un HTS. Le E339-3D6 possède un fragment tri-cationique peptidomimétique séparé par un espaceur aliphatique d'un groupement polyaromatique. Il possède des propriétés pharmacodynamiques (affinité, AMPc) environ 100 fois plus faibles que l'apéline-13. Le ML221 est une petite molécule bien plus "drug-like", mais faible antagoniste des voies AMPc et β -arrestine2. En revanche, il ne semble pas se lier sur le site orthostérique.

Deux années plus tard, un nouvel HTS réalisé sur une très importante bibliothèque de 330,600 composés a permis d'identifier une touche (Hit) inhibant le recrutement de la β -arrestine2 par le récepteur APJ après induction par l'apéline-13 (via un essai de complémentation d'enzyme luminescente). Une campagne de chimie médicinale a conduit à la synthèse d'une centaine de composés menant au ML221 (**Figure 17**). Contrairement au E339-3D6, ML221 est une petite molécule de 385.3 g/mol totalement non peptidique, aux propriétés satisfaisants celles d'un composé "drug-like" (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002; Lipinski, 2004). Les essais de pharmacodynamie ont révélé qu'en présence d'une concentration fixe de 10 nM d'apéline-13, ML221 antagoniserait assez faiblement les voies AMPc (mode $G_{i/o}$) et β -arrestine2 avec des puissances respectives de 0.70 μ M et 1.75 μ M (Maloney et al., 2012). Bien que non stipulé dans l'article, les auteurs ont indiqué que ce composé ne déplace pas l'apéline-13 radiomarquée (résultats non publiés, communication privée). En somme, il est difficile de tirer des conclusions de SAR pouvant aider à mieux comprendre l'interaction entre apéline-13 et son récepteur.

En séparant par différents acides aminés deux cycles contenant le pharmacophore Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵, le groupe de Macaluso a découvert un antagoniste compétitif du récepteur APJ. En effet sur des cellules CHO transfectées avec le récepteur hAPJ, le composé cyclo(1-6)CRPRLC-KH-cyclo(9-14)CRPRLC affiche une affinité de 82 nM et antagonise, à hauteur de 14.8 µM, l'accumulation d'AMPc induite par la forskoline due à l'introduction de 3 nM d'apéline-13 (Macaluso et al., 2011). Cette investigation a permis de consolider l'hypothèse que l'épitope N-terminal Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ de l'apéline-13 est essentiel pour la liaison du ligand au récepteur. Plus encore, elle tend même à suggérer que ce fragment serait suffisant. Langelaan et ses collaborateurs ont récemment publié leurs travaux sur l'étude par spectroscopie RMN et modélisation moléculaire de la région N-terminale du récepteur de l'apéline ainsi que du premier domaine transmembranaire (Langelaan et al., 2013). En s'intéressant aux résidus du récepteur susceptible d'interagir avec l'épitope N-terminal de l'apéline-13, ces derniers ont pu identifier deux acides aminés anioniques, les résidus Asp²⁰ et Glu²³ situés sur la partie extracellulaire du récepteur APJ, qui pourraient être une cible privilégiée des deux résidus Arg de l'apéline pour faire des interactions électrostatiques ou ioniques. De plus, d'après leurs simulations de dynamique moléculaire, la distance entre les résidus Asp²⁰ et Glu²³ semblerait très faible à l'échelle moléculaire ($\approx 9 \text{ \AA}$) (**Figure 18**). Par extension, cela impliquerait que les deux fonctions guanidines de l'apéline-13 seraient à proximité l'une de l'autre. Dans une optique de chimie médicinale, cette information s'avère très précieuse pour l'élaboration d'une molécule qui serait plus petite que le ligand naturel et dont le fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ serait mimé par une portion non peptidique.

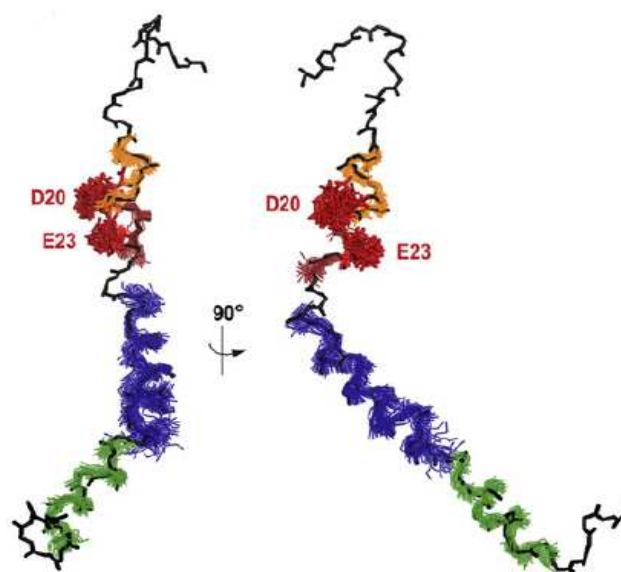


Figure 18. Structure des 55 premiers acides aminés du récepteur APJ (région N-terminale et 1^{er} domaine transmembranaire) obtenue par spectroscopie RMN et modélisation moléculaire. En noir, est représenté le squelette peptidique (sans chaînes latérales) des fragments correspondant aux acides aminés 1-14, en orange D¹⁴-C¹⁹, en rouge D²⁰-E²³, en bleu A²⁹-N⁴⁶ et en vert G⁴⁷-K⁵⁷. Cette image est la superposition des conformères de plus basses énergie calculés par l'association des résultats de spectroscopie RMN et des simulations de dynamique moléculaire (Langelaan et al., 2013).

Une autre information capitale qui ressort des travaux du groupe de Rainey concerne la remise en question des interactions que ferait le résidu Phe¹³ de l'apéline. En effet, le Trp¹⁵⁴ (TM^{IV}) du récepteur, décrit par Iturrioz et ses collaborateurs comme étant à proximité du résidu Phe¹³, semblerait être selon cette étude à une grande distance de la pochette de liaison du ligand. En revanche, le résidu Trp¹⁵⁴ serait en contact avec le résidu Ala⁶⁹ expliquant la perte d'affinité observée lors de la mutation affectant ainsi sévèrement l'intégrité structurale du récepteur. Ces travaux représentent un nouvel apport structural permettant de conforter l'hypothèse selon laquelle l'apéline-13 se lierait au récepteur APJ tout d'abord par le biais d'interactions ioniques de ses deux résidus Arg avec des résidus chargés négativement, puis la partie C-terminale du ligand irait se loger dans sa pochette de liaison située plus profondément dans les domaines transmembranaires.

En partant de travaux décrivant une amélioration significative de la stabilité plasmatique d'analogues de l'apéline-13 modifiés en C-terminal (Vickers et al., 2002; Murza et al., 2014), un groupe s'est très récemment intéressé à la caractérisation

signalétique et la stabilité protéolytique de nouveaux analogues peptidiques de l'apéline-13 tronqués en C-terminal (Zhang et al., 2014). En effet, les auteurs ont observé que la suppression des deux acides aminés C-terminaux Pro¹²-Phe¹³ conduit à une perte raisonnable de puissance sur la mobilisation de Ca²⁺ intracellulaire (19 nM vs. 0.42 nM). Le résidu Met¹¹ a par la suite été substitué par une série d'acides aminés aromatiques et lipophiles, puis ces modifications ont été combinés à des remplacements structurellement variés du fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷-Lys⁸. Plusieurs analogues présentent des profils intéressants, la substitution Met11Val mène à un EC₅₀ de 691 nM sur la voie Ca²⁺ (*NB: dans les pages de cette thèse, nous utiliserons la nomenclature Met11Val signifiant que la Met¹¹ de l'apéline-13 a été remplacée par une Val*). En revanche, l'analogue voisin Met11Leu possède une bonne puissance de 1.9 nM, la différence d'un facteur > 100 (par rapport au composé Met11Val) serait à l'évidence due à une très faible différence structurale. Il est donc envisageable que les résidus du récepteur responsables de l'activation de la voie Ca²⁺ forment une poche de liaison lipophile restreinte localisée autour du résidu Met¹¹. Une autre hypothèse pour cette étonnante différence signalétique serait associée à un réarrangement conformationnel complet du ligand occasionné par la présence d'une Val¹¹ et non par celle d'une Leu¹¹. Cependant, les données de liaison étant absentes, il est difficile de tirer des conclusions solides. Le groupe de Zhang s'est par la suite penché sur la stabilité plasmatique *in vitro* et le patron de dégradation protéolytique de l'analogue Ac¹-Arg²-Pro³-Nle⁴-Leu⁵-Ala⁶-Ala⁷-Nle⁸-Gly⁹-Pro¹⁰-Leu¹¹. Ce dernier affiche une étonnante puissance sur la voie Ca²⁺ (33 nM) malgré le fait que de nombreux acides aminés aient été remplacés. De façon surprenante, la demie-vie plasmatique apparaît comme voisine du ligand naturel et les sites de clivage, déterminés par spectrométrie de masse (MS), sont entre Nle⁴-Leu⁵ et Ala⁶-Ala⁷. Les modifications chimiques n'ont pas eu les résultats escomptés par les auteurs, contrastant également avec ceux que nous avons obtenu (Murza et al., 2014). Depuis 2010, de plus en plus d'études de chimie médicinale sur le système apélinergique voient le jour, toutefois de nombreuses zones d'ombre restent à élucider afin d'affiner la structure du ligand pour le rendre plus proche d'un médicament, tout en conservant les propriétés pharmacodynamiques. Cette étape nécessite au préalable une meilleure compréhension de la relation structure-fonction.

4. Le concept de sélectivité fonctionnelle ou de signalisation biaisée "ligand-biased signaling"

4.1. Définitions

Depuis ces dernières années, les études portant sur le biais signalétique des RCPG se font de plus en plus nombreuses. C'est un domaine qui connaît un véritable essor, d'autant plus que ces récepteurs constituent 40% des cibles des médicaments d'ordonnance (Lagerström and Schiöth, 2008). Avant de décrire ce concept de sélectivité fonctionnelle, il convient d'introduire le phénomène d'activation d'un RCPG. Classiquement, la communauté scientifique a longtemps considéré le RCPG comme existant sous deux états ou conformations bien distinctes. Le récepteur serait en équilibre entre un état actif ou "on" durant lequel toutes les voies de signalisation seraient activées, et un état "off" (De Lean et al., 1980; Gether and Kobilka, 1998; Kenakin, 2002). Des stimuli extracellulaires, comme des hormones, des peptides, des neurotransmetteurs ou de simples acides aminés, seraient responsables du passage du RCPG d'une conformation à l'autre. Dans ce modèle classique, les ligands ont été classés comme des agonistes, antagonistes ou agonistes inverses du fait de leurs capacités à stabiliser l'état "on" ou "off" mais également à diminuer le couplage basal du récepteur aux protéines G (ou activité constitutive) (Barker et al., 1994; Chidiac et al., 1994). En d'autres termes, une molécule agoniste va activer toutes les voies de signalisation du RCPG conduisant à l'effet physiologique associé au récepteur. À l'inverse un composé antagoniste n'activera aucune voie de signalisation et de fait il y aura une absence d'effet physiologique. Un antagoniste compétitif interagira au niveau du site de liaison du ligand endogène (site orthostérique) et un non-compétitif à un site distant (site allostérique).

De nombreux travaux ont au fur et à mesure mis en évidence que ce modèle classique était trop simpliste. En effet, un RCPG peut adopter un grand nombre de conformations différentes (Yao et al., 2006). Un ligand va pouvoir stabiliser une conformation du récepteur dans laquelle une voie de signalisation sera activée au détriment d'autres voies. Ce phénomène est appelé la sélectivité fonctionnelle ou encore signalisation biaisée ("ligand-biased signaling"), la molécule en question sera alors qualifiée d'agoniste biaisé (Kenakin, 1995; Jarpe et al., 1998; Rajagopal et al., 2010). La **figure 19** illustre différents

cas de sélectivité fonctionnelle en comparant deux voies, une dépendante des G-protéines et l'autre dépendante des β -arrestines. Dans le cas d'un ligand "normal", il y aura activation indifféremment des protéines G et de la β -arrestine. Le biais signalétique peut provenir du ligand ou du récepteur, favorisant ainsi les voies dépendantes des protéines G ou des β -arrestines. Soulignons que l'absence de recrutement de cette dernière va, dans la majorité des cas, mener à une non-désensibilisation et internalisation du RCPG.

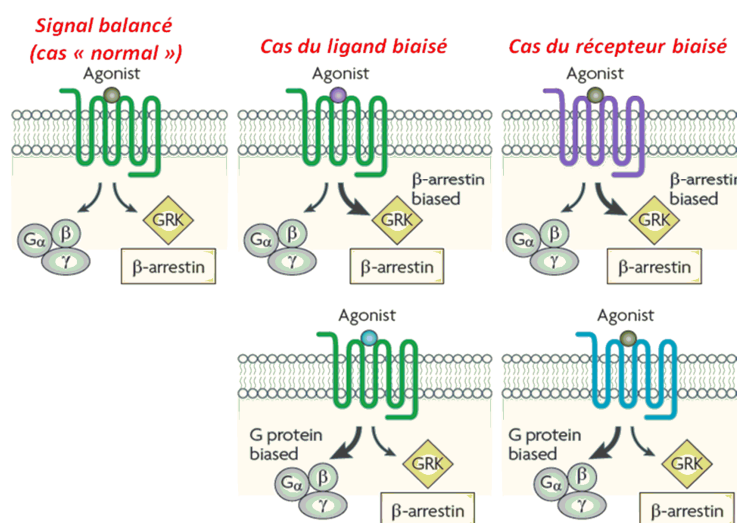


Figure 19. Schéma explicatif d'une signalisation équilibrée, biaisée par le ligand ou par le récepteur. Dans le cas d'un signal équilibré, l'agoniste active la signalisation dépendante des protéines G et des β -arrestines indifféremment. La liaison d'un agoniste biaisé provoque l'activation préférentielle des voies protéines G ou β -arrestines. Le troisième cas est celui d'un ligand qui n'est pas biaisé, mais qui se lie à un RCPG biaisant l'une ou l'autre voie de signalisation (Rajagopal et al., 2010).

4.2. Intérêts thérapeutiques de la sélectivité fonctionnelle

La phénomène de sélectivité fonctionnelle fait l'objet d'une attention grandissante et apparaît comme un nouveau paradigme prometteur pour la découverte de médicaments (Whalen et al., 2011; Kenakin and Christopoulos, 2013; Rominger et al., 2014). Les effets physiologiques bénéfiques recherchés d'un RCPG sont souvent associés à l'activation de voies de signalisation bien distinctes de celles des effets secondaires néfastes. Dans cette optique, une molécule capable d'activer sélectivement les effecteurs signalétiques voulus permettrait de diminuer, voir d'annuler, les effets indésirables. Dû à la nouveauté du concept, les études décrivant la découverte d'agonistes biaisés restent encore plutôt rares.

Le meilleur exemple est celui de la petite molécule non peptidique et "drug-like" TRV130. Cette dernière agit sur le récepteur μ -opioïde et induit une diminution de formation d'AMPc via un mécanisme dépendant de $G\alpha_{i/o}$ mais provoque très peu de recrutement de la β -arrestine2 et conduit à une faible internalisation du récepteur. TRV130, qui est aussi puissant que la morphine sur la voie AMPc mais qui ne recrute pas la β -arrestine2, présente un effet analgésique chez le rat et la souris supérieur à celui de la morphine. En revanche, les effets secondaires de dépression respiratoire et de troubles gastro-intestinaux présents avec la morphine apparaissent considérablement réduits lors du traitement par TRV130 (DeWire et al., 2013). Ce même groupe s'est intéressé par ailleurs au récepteur AT1 et a ainsi découvert le TRV120027 qui antagonise l'accumulation d'inositol monophosphate (IP_1) dépendante de $G\alpha_q$ stimulée par l'angiotensine II mais provoque l'activation des protéines kinases ERK1/2 et Src via un recrutement des β -arrestines. Le losartan et le telmisartan ont été décrits comme des antagonistes d'AT1, plus spécifiquement ils n'activent ni les protéines $G\alpha_q$ ni la β -arrestine2. Contrairement à ces deux composés antagonistes non-biaisés, le TRV120027 semble augmenter les performances cardiaques chez le rat et le chien tout en bloquant les effets vasoconstricteurs et hypertenseurs délétères liés au système rénine-angiotensine médié par AT1 (Violin et al., 2010; Boerrigter et al., 2012). Enfin, il est important de mentionner que les deux composés TRV décrits plus haut interagissent au niveau des sites orthostériques, ils sont donc de type compétitif.

La possibilité de diriger la signalisation d'un RCPG par le ligand représente une avenue extrêmement prometteuse pour le développement d'une nouvelle classe de médicaments permettant d'avoir un meilleur contrôle sur les effets physiologiques secondaires nocifs.

5. Les techniques de transfert par résonance non radiative

Les méthodes permettant de visualiser qualitativement et quantitativement l'activation des voies de signalisation dépendantes ou indépendantes des protéines G ont beaucoup évolué au cours des dernières années. Des techniques biophysiques, exploitant un transfert d'énergie de résonance non radiative (RET), ont été mises au point et permettent d'évaluer les interactions protéines-protéines ainsi que la formation de complexes protéiques. Ces approches sont toutes basées sur le transfert d'énergie entre une molécule

donneuse et une molécule acceptrice d'énergie. Cette dernière réémettra à son tour cette énergie pour donner un signal différent du donneur (Cardullo, 2007). L'efficacité du transfert dépend de la distance séparant le couple donneur/accepteur qui varie entre 30 et 100 Å. Cette distance maximale permettant le maintien du transfert d'énergie va également dépendre du couple donneur/accepteur employé (Förster, 1948). Une faible distance entre le donneur et l'accepteur entraînera un important transfert d'énergie (et donc un fort signal) et inversement. Cette efficacité est également dépendante d'une orientation permissive des dipôles électroniques du couple, un recouvrement est nécessaire entre les maximums d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur pour obtenir un transfert d'énergie non radiatif spontané. D'un point de vue pratique, il est donc possible d'étiqueter des protéines d'intérêts avec des molécules donneuses et acceptrices puis de suivre l'évolution des interactions protéiques en temps réel.

5.1. Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)

Le FRET est basé sur un principe physique, découvert en 1946 par Förster, selon lequel l'excitation d'une molécule donneuse d'énergie mène à un transfert d'énergie non radiatif à une molécule acceptrice par le biais d'une interaction dipôle-dipôle des nuages électroniques de chacun des fluorophores (Förster, 1948). Les deux molécules doivent cependant être à moins de 100 Å, avoir une orientation dipolaire permissive et les spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur doivent se chevaucher le plus possible pour que le transfert d'énergie soit optimal. L'innovation probablement la plus importante dans le domaine des fluorophores fut marquée par la découverte d'une protéine fluorescente par Shimomura, Chalfie et Tsien (Prix Nobel de Chimie en 2008), la GFP (Green Fluorescent Protein), pouvant être directement encodée à l'intérieur de la cellule (Prasher et al., 1992). Les propriétés avantageuses d'auto-fluorescence de la GFP proviennent du fait que sa séquence primaire en acides aminés et que la formation du chromophore ne dépendent nullement de cofacteurs ou d'activités enzymatiques. De plus, la GFP a une structure en forme de cylindre composée de 11 feuillets β entourant le chromophore lui octroyant une exceptionnelle résistance à la chaleur, aux détergents, aux solvants organiques et aux protéases communes (Tsien, 1998). Elle est ainsi devenue un outil

incontournable de la biologie cellulaire en permettant de suivre la localisation et le mouvement d'autres protéines auxquelles elle a été génétiquement fusionnée. Différentes protéines mutantes de la GFP ont par la suite été produites. En changeant les acides aminés formant le chromophore, il a été possible de modifier les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de la GFP devenant alors une BFP (Blue Fluorescent Protein), une YFP (Yellow Fluorescent Protein) et d'autres variantes (CFP, RFP,...) (Cubitt et al., 1995). Le couple de fluorophores communément utilisé est la CFP comme donneur et la YFP comme accepteur d'énergie. Le pic d'émission du CFP se situe à 475 nm et va être en mesure de transférer son énergie à la YFP dont le pic d'excitation est à 515 nm. Ces deux pics se chevauchent suffisamment pour que la YFP soit activée par la CFP lorsque ces deux entités se retrouvent à proximité l'une de l'autre (**Figure 20**).

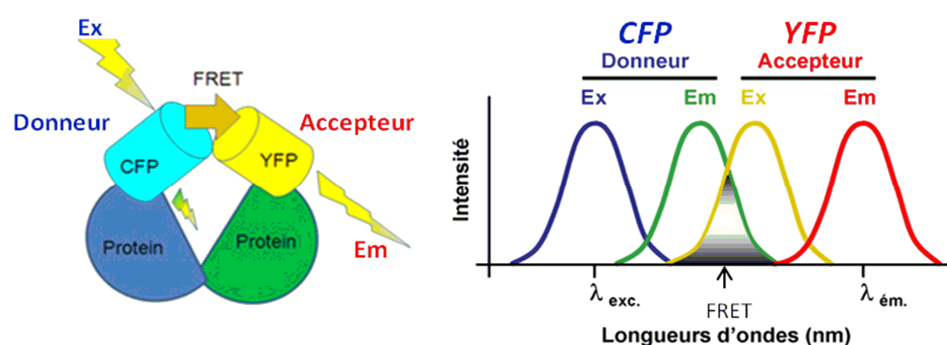


Figure 20. Représentation du transfert d'énergie de type FRET. Deux protéines d'intérêts sont étiquetées avec le couple CFP/YFP. Après excitation à la longueur d'onde λ_{ex} , le CFP (donneur) va émettre de l'énergie à ses longueurs d'ondes d'émissions. Si la deuxième protéine d'intérêt est à proximité de la première, le YFP (accepteur) va à son tour être excité grâce à un transfert d'énergie FRET. Le YFP émettra de l'énergie alors à une longueur d'onde $\lambda_{\text{ém}}$ qui va être mesurée pour évaluer le degré d'interaction entre les deux protéines.

Plusieurs autres couples de fluorophores dérivés de la GFP sont largement utilisés notamment BFP/GFP. Les chélates et cryptates de lanthanides (principalement Europium et Terbium) sont également des donneurs d'énergie utilisés comme sondes dans des systèmes d'analyse et de diagnostic. Le FRET peut être combiné à la microscopie pour localiser les interactions protéiques en cellules vivantes, suivre la cinétique et le mouvement de ces interactions. Cet outil, d'une grande versatilité, est très largement utilisé de nos jours pour

mesurer le recrutement ou la dissociation d'une protéine à une autre dans un contexte cellulaire.

5.2. Le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET)

Le BRET est un phénomène naturel se produisant chez certains êtres vivants tels la *Renilla reniformis* et l'*Aequorea victoria*. Cette technique est basée sur la bioluminescence qui est retrouvée dans plusieurs organismes (bactéries, coelenterates, dinoflagellés et lucioles). La production de lumière résulte de l'oxydation de la luciférine qui est le substrat d'une photoprotéine appelée luciférase (Wilson and Hastings, 1998). Cette dernière est une enzyme bioluminescente qui va jouer le rôle du donneur d'énergie, il s'agit de la différence majeure avec le FRET. La séquence en acides aminés des luciférases varie sensiblement d'un organisme à l'autre, et sont classées en trois grandes catégories selon l'organisme dont elles proviennent; les Lux représentant la classe des bactéries, les Lcf pour les dinoflagellés et enfin les Luc pour les lucioles (Wilson and Hastings, 1998). La production de lumière provient de la catalyse par la luciférase de l'oxydation de la luciférine (benzothioazoyl-thiazole) en présence d'ATP et de Mg^{2+} . Les coelenterates produisent de la lumière sans ATP et en présence de Ca^{2+} comme cation bivalent. Dans ce cas, la *Renilla Luciferase* (Rluc) va catalyser l'oxydation de la luciférine nommée plus spécifiquement coelentrachine en coelentramide entraînant la production de lumière. Lorsque la luciférase est à proximité ($< 100 \text{ \AA}$) des protéines GFP, l'énergie sous forme de lumière, provenant de l'oxydation décrite plus haut, est transférée à la GFP qui réémettra cette énergie à une autre longueur d'onde (Xu et al., 1999). Ce transfert de la luciférase à la GFP dépend de l'orientation des deux protéines, de la distance les séparant et du chevauchement des spectres d'émission de la luciférase et d'excitation de la GFP. Le ratio BRET va être déterminé selon le rapport de la lumière provenant de la GFP sur la lumière produite par la luciférase.

Le BRET a connu une sensible amélioration au cours des années. En effet, la première configuration développée utilise la Rluc et la coelentrachine-h comme donneur d'énergie et la protéine YFP comme acceptrice. La bioluminescence produite par la luciférase possède un maximum d'émission à 480 nm, la YFP a un maximum d'excitation à 510 nm. Cette différence de recouvrement des spectres du donneur et de l'accepteur n'est

pas optimale, ceci se traduit par une moins bonne efficacité du transfert d'énergie. Afin d'améliorer cela, un nouveau substrat, la coelentrachine-400a, a été développé. Cette dernière possède un maximum d'émission à 400 nm et, couplé à l'utilisation d'une GFP modifiée (la GFP²) qui possède un maximum d'excitation à 420 nm, le recouvrement des spectres est ainsi accru entraînant un meilleur transfert d'énergie entre donneur et accepteur. De plus, la séparation entre les spectres d'émissions de la coelentrachine-400a et de la GFP² est plus importante. En conséquent, cela facilite la mesure et améliore le ratio de BRET. Cette variante est communément nommée BRET² (**Figure 21**).

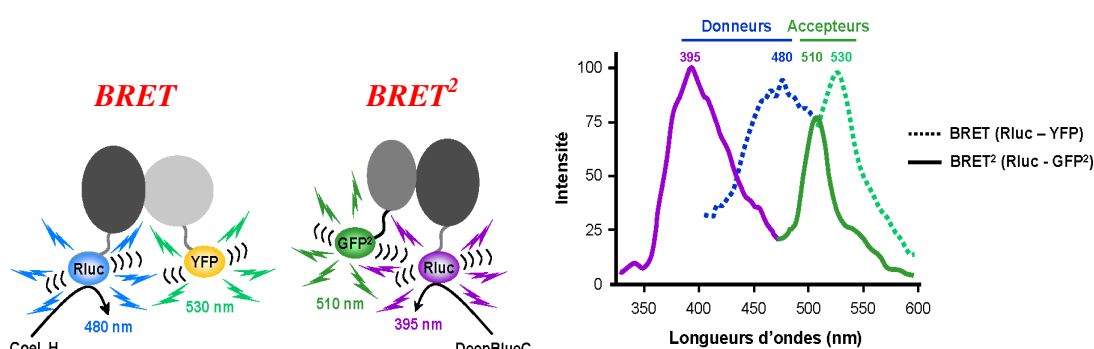


Figure 21. Représentation du transfert d'énergie de type BRET et BRET². Le BRET utilise le couple Rluc/YFP et le substrat coelentrachine-h (en pointillés). L'espace séparant λ_{em} du donneur et λ_{ex} de l'accepteur n'est pas optimal. La distance entre λ_{em} du donneur (480 nm) et λ_{em} de l'accepteur (530 nm) entraîne un recouvrement partiel de ces spectres conduisant à un mauvais ratio BRET. Dans le cas du BRET² (en trait plein), la GFP² est l'accepteur et le substrat de la Rluc est la coelentrachine-400a ou DeepBlueC. Le recouvrement λ_{em} du donneur et λ_{ex} de l'accepteur est accru. La distance entre λ_{em} du donneur (395 nm) et λ_{em} de l'accepteur (510 nm) est bien plus importante garantissant un meilleur ratio BRET.

Le groupe du Dr. Bouvier fait office de pionnier dans l'utilisation de la technologie BRET pour la mesure d'interactions entre un RCPG et une protéine d'intérêt. Par cette technique, les auteurs ont pu suivre le recrutement de la β -arrestine suite à l'activation du récepteur β_2 -adrénergique (Angers et al., 2000). Depuis, le BRET est devenu une méthode de choix dans la découverte de ligands biaisant des voies de signalisation d'un RCPG. En effet, avec l'avancée des connaissances en biologie moléculaire, il est possible d'étiqueter le couple donneur/accepteur d'énergie au sein de différents effecteurs intracellulaires et même sur les sous-unités des protéines G. Puis, sur des cellules transfectées par ces protéines, une

évaluation de la dissociation de la sous-unité $G\alpha_i$ des sous unités $G\beta\gamma$ par exemple par un récepteur d'intérêt, suite à l'introduction d'un ligand donné, peut être entreprise. Plusieurs études récentes ont investigué l'activation, par des ligands, des voies de signalisation dépendantes et indépendantes des protéines G (Audet et al., 2012; Ceraudo et al., 2014), faisant de la technologie BRET une incontournable pour la recherche de nouveaux médicaments ciblant les RCPG.

6. Les macrocycles comme outils dans la découverte de nouveaux médicaments

L'engouement, des programmes de recherche sur de nouveaux traitements thérapeutiques, en faveur des composés macrocycliques a considérablement augmenté ces 10 dernières années. Les premiers médicaments dont le principe actif est un macrocycle sont apparus autour des années 1980. La rapamycine, la cyclosporine ou encore l'érythromycine sont des immunosuppresseurs et des antibiotiques d'origines naturelles provenant de différents types de sols dont la découverte dans certains cas fut fortuite (Wessjohann et al., 2005) (**Figure 22**). Hormis la cyclosporine qui est un peptide cyclique, les autres molécules de cette famille sont complexes et leur synthèse constitue un fastidieux travail pour les chimistes organiciens (Giordanetto and Kihlberg, 2014). La bonne marche d'un projet de recherche sur la découverte du médicament, pour une cible donnée, dépend en grande partie de la capacité à générer facilement et rapidement des composés aux propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques intéressantes. La chimie peptidique représente une méthode de synthèse organique aux qualités évidentes dans ce contexte. Un grand nombre de composés peut rapidement être généré par l'utilisation de la synthèse en phase solide. Le substrat naturel de la cible, RCPG ou enzyme, étant généralement un peptide, il sera ainsi plus aisé d'entreprendre des études de relations structure-activité conduisant à des composés de hautes affinités et puissances. Enfin, pour évaluer biologiquement un composé, ce dernier doit être idéalement soluble dans l'eau. Avec les peptides, ces problèmes sont inexistant dans la majorité des cas. En revanche, cette classe de molécules présente une faible biodisponibilité orale, stabilité protéolytique et un mauvais profil PK-ADME en général (pharmacocinétique, adsorption, désorption, métabolisation, excrétion et distribution). La cyclisation représente une alternative efficace

pour rendre un peptide plus "drug-like" (Driggers et al., 2008; Marsault and Peterson, 2011).

Il est aujourd'hui communément adopté qu'un macrocycle est composé de 12 atomes ou plus (Mallinson and Collins, 2012). Compte tenu de sa taille, le macrocycle viole souvent plusieurs des règles de Lipinski et de Veber et peut ainsi être perçu comme étant hors des normes d'un composé possédant une bonne biodisponibilité orale (Lipinski, 2001; Veber et al., 2002). En effet, son poids moléculaire est souvent supérieur à 500 g.mol⁻¹, le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaisons H ainsi que sa surface polaire (PSA) sont au delà des limites statistiques des médicaments existants sur le marché. Toutefois, certains avantages compensatoires découlent de la structure cyclique. La restriction conformationnelle de la molécule entraîne une diminution des degrés de liberté ce qui se traduit par un profil plus adéquat pour atteindre une biodisponibilité orale acceptable (Veber et al., 2002). D'autre part, une interaction optimale avec la cible implique que le composé adopte une conformation bioactive, cette opération entraîne un coût entropique. En limitant le nombre de conformations disponibles, la perte entropique liée au réarrangement du macrocycle pour interagir avec la cible sera ainsi diminuée se traduisant au final par un gain d'affinité (Mann and Wermuth, 2008). Il faut souligner que les macrocycles, bien que conformationnellement contraints, demeurent suffisamment flexibles pour s'ajuster à un site de liaison d'une protéine tout en minimisant la pénalité entropique associée au changement de forme entre les états liants et non-liants. L'indice de lipophilicité (log P) est un paramètre physico-chimique témoignant du caractère lipophile d'un composé. Statistiquement, une molécule aura une meilleure biodisponibilité orale si ce facteur est situé entre 2 et 5. Plusieurs études ont démontré que la cyclisation d'un peptide augmente sensiblement le log P et de fait améliore le profil PK-ADME (Burton et al., 1996; Adessi and Soto, 2002). Finalement, la structure cyclique du peptide, non naturelle et donc non reconnue par les protéases, offre une résistance accrue à la dégradation protéolytique diminuant ainsi la dose efficace requise pour observer un effet physiologique (McGeary and Fairlie, 1998).

De nombreuses méthodes de macrocyclisation ont été décrites dans la littérature (Marsault and Peterson, 2011; Mallinson and Collins, 2012) et il ne serait pas pertinent d'en

faire une liste dans ce manuscrit. Une attention particulière sera en revanche portée à la méthode que nous avons utilisé dans notre projet. La fermeture de cycle par métathèse des oléfines ou "Ring-Closing Metathesis" (RCM) permet la formation d'un cycle, fermé par une liaison alcène, obtenu par une réaction faisant intervenir un catalyseur au ruthénium et deux fonctions alcènes. Basée sur les travaux de Grubbs (Miller et al., 1996), cette technique est devenue une des plus populaires réactions de synthèse de macrocycles (Martin and Blechert, 2005; Van de Weghe and Eustache, 2005), et a valu à R. Grubbs, R. Schrock et Y. Chauvin le prix Nobel de chimie en 2005. Contrairement à un pont disulfure ou à un pont amide qui s'avèrent plus sensibles à la dégradation, l'alcène formé suite à la RCM ne peut être reconnu et clivé par les enzymes. La RCM est très spécifique aux alcènes ou aux alcynes et offre une importante tolérance (orthogonalité) aux autres fonctions chimiques présentes sur le peptide. Les conditions réactionnelles nécessaires à la cyclisation sont suffisamment douces pour ne pas dégrader le reste de la molécule. Bien que le catalyseur de Grubbs de seconde génération demeure un choix privilégié, plusieurs autres sont disponibles et peuvent éventuellement conduire à une optimisation des conditions et des rendements obtenus. Il est en revanche difficile de sélectivement former l'alcène voulu puisqu'un mélange des deux isomères sera généralement obtenu. Lors de l'étape de purification, la séparation des isomères Z et E est envisageable si la différence de polarité entre les deux est suffisante. Comme toute méthode de cyclisation, l'efficacité de la RCM s'avère très dépendante du substrat (facteur stérique, taille du cycle, présence forte d'hétéroatomes) (Marsault and Peterson, 2011).

Le potentiel thérapeutique des macrocycles est déjà bien exploité et a conduit récemment à plusieurs candidats en phase clinique avancée. Par exemple, le Cilengitide® est un cycle peptidique à 15 atomes, fermé par un pont amide, qui a démontré des effets anti-angiogéniques dans le traitement de glioblastomes (Mas-Moruno et al., 2010; Stupp et al., 2010) (**Figure 22**). Des études structurales menées par Boehringer-Ingelheim Montréal à partir d'un peptide cyclique ont conduit à la conception du Ciluprevir®, un composé macrocyclique utilisé dans le traitement de l'hépatite C (Reiser et al., 2005) (**Figure 22**). Chez les RCPG, des agonistes de la ghréline et des antagonistes de la motiline, des hormones aux rôles clés dans le système gastro-intestinal, ont été récemment identifiés (Marsault et al., 2006; Fraser et al., 2009). Ces molécules macrocycliques sont composées

d'un fragment peptidique correspondant au pharmacophore et d'un espaceur non peptidique. Le TZP-101 (Ulimorelin), le plus avancée de la série, a démontré une efficacité dans le traitement de l'obstruction intestinale post-opératoire après administration par voie intraveineuse (Hoveyda et al., 2011) (**Figure 22**).

Ces quelques exemples mettent en évidence le potentiel thérapeutique des macrocycles. En plus d'offrir une amélioration des paramètres pharmacocinétiques par rapport à leurs homologues linéaires, ils permettent de balayer efficacement l'espace chimique d'une poche de liaison sans alourdir la molécule. Dans le cadre de notre projet, nous avons vu que les deux pharmacophores de l'apéline-13 sont distants. L'intégration d'un macrocycle représente donc une alternative séduisante pour séparer deux épitopes distants tout en gardant une certaine rigidité. Couplé à des études structurales de modélisation moléculaire, l'utilisation de peptides macrocycliques va permettre de mieux comprendre l'interaction ligand-récepteur et ainsi conduire à la synthèse de potentiels candidats thérapeutiques.

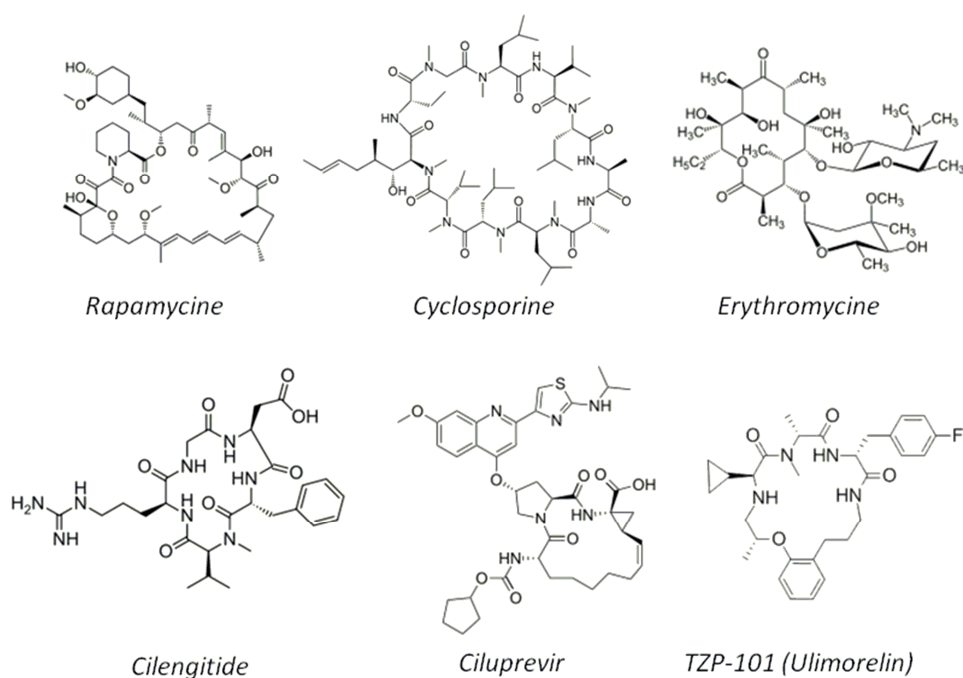


Figure 22. Structures chimiques de la Rapamycine, la Cyclosporine, l'Erythromycine, le Cilengitide, le Ciluprevir, et le TZP-101 (Ulimorelin).

PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSES

Les statistiques de l'association internationale pour l'étude de la douleur révèlent que 20% de la population mondiale souffre de douleur chronique, les molécules agissant sur les RCPG comptant pour 40% des médicaments prescrits (Wise et al., 2002). L'apéline et son récepteur, couplé aux protéines G, possèdent les mêmes localisations dans le cerveau que les récepteurs aux opioïdes connus pour être responsables de la majorité des effets analgésiques recherchés en clinique (Melnikova, 2010; Raehal et al., 2011). De plus, le système apélinergique a récemment démontré des effets analgésiques chez la souris (Xu et al., 2009; Lv et al., 2012). Cela suggère donc que cette cible pourrait avoir un rôle dans la modulation de la douleur et qu'elle représenterait une alternative à la voie traditionnelle des dérivés opiacés (morphine) connus pour induire des effets secondaires indésirables tels que les phénomènes de dépendance, de tolérance, de constipation, de dépression respiratoire et autres (McClung, 2006). En parallèle, le système apélinergique a une forte implication au niveau cardiovasculaire. Le choc septique et les désordres cardiovasculaires sont deux problèmes majeurs de santé publique en Amérique du Nord (Opal, 2009). De récentes études ont mis en évidence des différences de niveaux plasmatiques d'apéline chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique (Japp and Newby, 2008). Le complexe apéline-APJ apparaît également comme une cible à fort potentiel thérapeutique dans ce paradigme. Cependant, il y a très peu d'information connue au niveau de la SAR avec le récepteur APJ. Les rôles antinociceptifs et cardiovasculaires de l'apéline n'ont pas encore été clairement définis au niveau fonctionnel.

Nous posons l'hypothèse que la synthèse d'analogues stables de l'apéline-13 pourrait nous fournir les outils pharmacologiques qui permettront de mieux comprendre les rôles physiologiques et pathologiques de l'apéline, et également d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la modulation de la douleur, les effets hypotenseurs et cardioprotecteurs de notre cible. Ce projet de recherche à fort potentiel translationnel vise également à raffiner nos connaissances de la SAR dans le but d'évoluer vers une structure non peptidique plus proche d'un potentiel candidat clinique.

Nos objectifs sont donc les suivants:

- 1) Étudier la relation structure-activité par la synthèse d'analogues peptidiques de l'apéline-13 modifiés en C-terminal et la mesure de leur affinité sur le récepteur APJ (*Articles 1 et 3*).
- 2) Déterminer l'efficacité des analogues sur différentes voies de signalisation protéines G dépendantes et indépendantes (*Articles 1 et 3*).
- 3) Évaluer *in vivo* les effets analgésiques, sur un modèle de douleur tonique, et les effets hypotenseurs des nouveaux composés afin de faire le lien entre la sélectivité fonctionnelle et les effets physiologiques (*Article 3 et résultats supplémentaires*).
- 4) Déterminer le profil de dégradation protéolytique *in vitro* et *in vivo* chez le rat de l'apéline-13 et identifier des analogues proposant des modifications chimiques menant à une amélioration significative de la demi-vie plasmatique (*Article 2*).
- 5) Dans le but de simplifier et réduire la structure de nos molécules, concevoir une première série d'analogues macrocycliques de l'apéline-13 à l'aide des conclusions tirées de la SAR et les tester dans nos essais pharmacodynamiques et physiologiques (*Résultats supplémentaires*).

ARTICLE 1

Elucidation of the structure-activity relationships of apelin: influence of unnatural amino acids on binding, signaling and plasma stability

Auteurs de l'article: Alexandre Murza, Alexandre Parent, Élie Besserer-Offroy, Hugo Tremblay, Félix Karadereye, Nicolas Beaudet, Richard Leduc, Philippe Sarret, Éric Marsault

Statut de l'article: Publié dans *ChemMedChem*, **2012**, 7(2), 318-25.

Avant-propos: J'ai réalisé la synthèse de tous les composés sauf trois, ainsi que les études de radiolisation, et de stabilité plasmatique *in vitro*. Les essais sur la voie AMPc ont été réalisés par Alexandre Parent et par moi-même, les essais BRET² de recrutement de la β -arrestine2 furent menés par Élie Besserer-Offroy. J'ai écrit la première version du manuscrit.

Cet article contribue à répondre aux objectifs 1) et 2).

Note: Les chromatogrammes et les spectres de masse des analogues faisant partie du matériel supplémentaire sont présentés en annexe à la fin de manuscrit.

Résumé: L'apéline est le ligand endogène du récepteur APJ, un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Le complexe apéline-APJ a été détecté dans de nombreux tissus et apparaît comme une cible prometteuse dans le traitement de plusieurs désordres physiopathologiques. À ce jour, il y a très peu d'informations concernant la relation structure-activité (SAR) du ligand avec son récepteur. Afin de mieux comprendre la SAR, nous avons synthétisé une série d'analogues de l'apéline-13 modifiés à des positions clés avec des acides aminés non-naturels, une attention particulière a été portée à la portion C-terminale. Les analogues apélinergiques ont été testés en radioliation et nous avons évalué leurs capacités à diminuer la formation d'AMPc, voie médiée par la protéine $G_{\alpha_{i/o}}$, et à provoquer le recrutement de la β -arrestine2 par le récepteur APJ. Enfin, la stabilité plasmatique *in vitro* des nouveaux analogues a également été évaluée. Plusieurs modifications ont mené à des améliorations de l'affinité et à une stabilité plus importante que le ligand naturel.

MANUSCRIT DE L'ARTICLE 1

Elucidation of the structure/activity relationships of apelin: influence of unnatural amino acids on binding, signaling and plasma stability

Alexandre Murza,^[a,b] Alexandre Parent,^[b] Elie Besserer-Offroy,^[a,b] Hugo Tremblay,^[a] Félix Karadereye,^[a] Nicolas Beaudet,^[b] Richard Leduc,^[a] Philippe Sarret,^[b] Eric Marsault ^{[a],*}

^[a]*Département de pharmacologie,* ^[b]*Département de physiologie et biophysique, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

* Corresponding author:

Éric Marsault, Ph.D.

Université de Sherbrooke

Faculty of medicine and health sciences

Pharmacology department

3001, 12^{ème} Avenue Nord

Sherbrooke QC, J1H5N4

CANADA

Email: eric.marsault@usherbrooke.ca

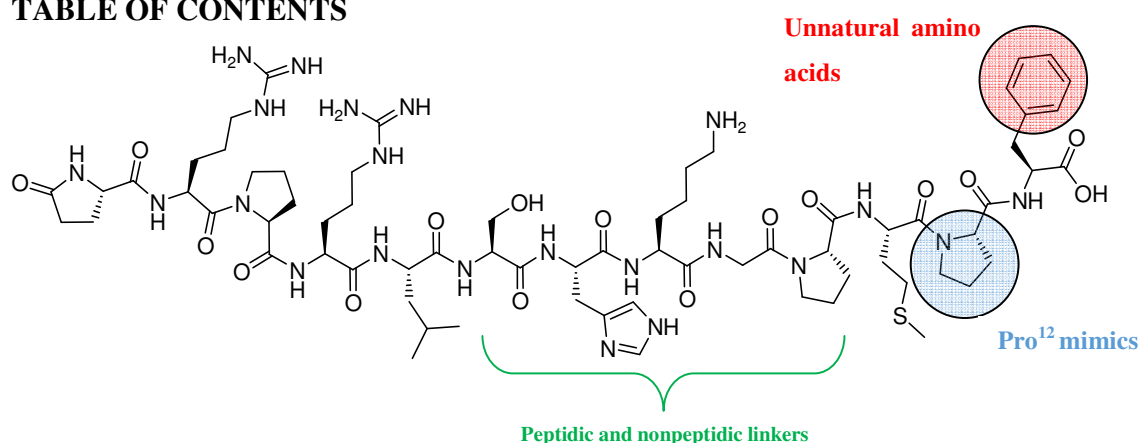
KEYWORDS

Apelin, plasma stability, receptors, signaling, structure-activity relationships

ABSTRACT

Apelin is the endogenous ligand of the APJ receptor, a member of the G protein-coupled receptor family. The apelin/APJ complex has been detected in many tissues and is emerging as a promising target for a number of pathophysiological conditions. There is currently little information on the structure/activity relationship (SAR) of the apelin hormone. In an effort to better delineate SAR, we synthesized analogs of apelin-13 modified at selected positions with unnatural amino acids, with a particular emphasis on the C-terminal portion. Analogs were then tested in binding and functional assays by evaluating $G_{i/o}$ mediated reduction in cAMP levels and by assessing β -arrestin2 recruitment to the receptor. The plasma stability of new analogs was also assessed. Several were found to possess increased binding and higher stability compared to the parent peptide.

TABLE OF CONTENTS



The SAR of apelin-13 with the APJ receptor was evaluated by D-scan, replacement of Phe¹³ and Pro¹² and the central portion with selected unnatural amino acids. The activity of analogs was tested in binding and functional assays on the G_i and β -arrestin2 pathways, and their stability in plasma assessed.

INTRODUCTION

The apelin receptor (angiotensin receptor like-1; APJ) was cloned in 1993 ^[1] and later deorphanized when its endogenous ligand, apelin, was isolated from bovine stomach extracts by Tatemoto *et al.* ^[2]. The apelin/APJ system has since been detected in many peripheral tissues such as heart, kidney, pancreas and lungs, as well as in the central nervous system, suggesting diverse roles in human physiology ^[3-14]. In the past decade, several studies have confirmed the involvement of apelin peptides in various normal and pathological conditions, including cardiovascular, metabolic, gastrointestinal diseases, tumor angiogenesis, hypoxia, and HIV infection ^[15-24]. The pathophysiological roles and potential applications of the apelin/APJ system are the subject of a growing body of literature and were reviewed recently ^[25].

The APJ receptor belongs to the rhodopsin-like G protein-coupled receptor (GPCR) family and shares a high homology with the angiotensin 1 receptor (AT1R) ^[1]. Activation of the apelin receptor triggers intracellular signaling pathways through $G_{i/o}$ - and G_q -mediated coupling ^[26, 27], leading to the reduction of cAMP production, release of internal calcium stores, and activation of mitogen-activated protein-kinases (ERK1/2) and phospholipase C ^[28, 29]. The activated APJ receptor also recruits both β -arrestin1 and β -arrestin2 and internalizes through different trafficking routes ^[30].

Following proteolysis, apelin peptides of different lengths are produced, of which apelin-36, -17, -13 (or its pyroglutamate analog Pyr¹-apelin-13 **[Figure 1]**) are the most predominant; these different forms have been investigated in several contexts.

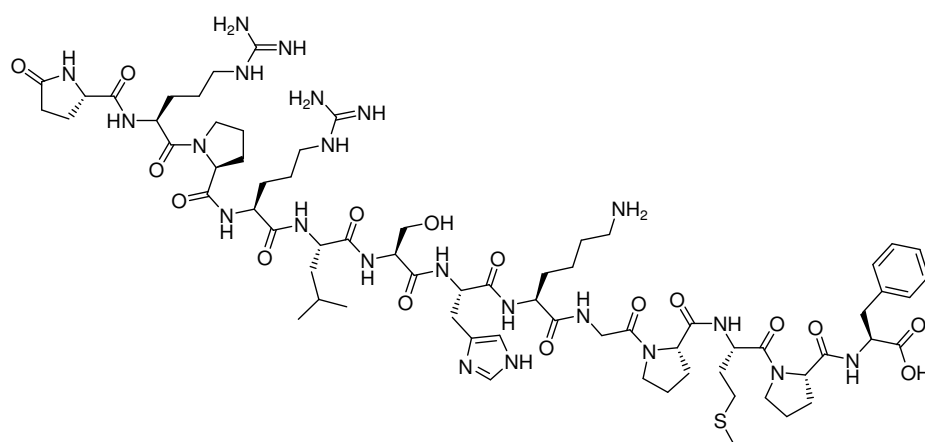


Figure 1. The pyroglutamate analogue of apelin-13: Pyr¹-apelin-13

In terms of structure, Langelaan *et al.* [31] thoroughly studied the solution conformations of apelin-17 and demonstrated that the peptide does not possess α -helical or β -sheet secondary structure as revealed by circular dichroism (CD) spectroscopy. They also reported that the Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ segment adopts a more ordered structure as shown by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (2D NMR) [31]. This observation and that from the alanine scan (see below) was exploited by Macaluso *et al.* and by Hamada *et al.* to design macrocyclic APJ agonists and antagonists [32-34]. In terms of Structure-Activity Relationships (SAR), Medhurst *et al.* reported a detailed alanine scan performed on Pyr¹-apelin-13 [26], pinpointing key residues involved in APJ receptor binding (Pyr¹-apelin-13: Pyr¹-Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷-Lys⁸-Gly⁹-Pro¹⁰-Met¹¹-Pro¹²-Phe¹³) and in activation of the G_{i/o} pathway. Indeed, substitutions of Arg² and Leu⁵ were shown to lead to a 1.7 log decrease in binding and second messenger coupling [23, 26], consistent with a role as potential pharmacophoric residues. This is also in agreement with the higher level of order of this segment of the peptide [31]. Additionally, truncation of the N-terminal end resulted in a marked decrease in both affinity and efficacy, in agreement with the pharmacophore model proposed by Itturioz *et al.* who recently reported the first non-peptidic APJ agonist E339-3D6 (IC₅₀ 430 nM) [35]. This molecule, which contains a tricationic moiety coupled to a polyaromatic fluorophore through a flexible hydrophobic spacer, is thought to interact with the APJ receptor via two distant epitopes. On the one hand, these interactions involve cationic residues Arg² and Arg⁴ in the N-terminal of the peptide (Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵) and residues Asp¹⁸⁴ and Asp²⁸² of the APJ receptor, and on the other hand a hydrophobic, π -stacking type interaction between the C-terminal Phe¹³ residue and a polyaromatic pocket deep in the transmembrane domain involving residues Trp¹⁵², Trp²⁵⁹ and Phe²⁵⁵ of the APJ receptor [36]. Finally, apelin is hydrolyzed by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2), which cleaves the peptide between residues Pro¹² and Phe¹³, resulting in a half-life inferior to 1 min [37].

Based on these observations, our aim was to better delineate Structure-Activity Relationships (SAR) of apelin and the APJ receptor with respect to binding and functional efficacy on the G_{i/o}- and the β -arrestin2 signaling pathways. Toward this end, we first performed a (D)-scan on every position, then focused on the C-terminal segment by replacing selected residues by unnatural amino acids. Modifications to the central portion

of the peptide were also performed with nonpeptidic residues. Finally, plasma stability of the new synthesized analogs was assessed.

RESULTS AND DISCUSSION

D-scan

In order to better understand the role of each residue of apelin-13 and as a complement to the reported alanine scan data ^[26], we performed a systematic replacement of each residue by its D-isomer [Table 1].

Table 1. Sequence of the D-scan compounds, binding affinity and functional assays.				
N°	Sequence	Binding	Functional assays	
		IC ₅₀ (nM) ^[a]	EC ₅₀ cAMP (nM) ^[b]	cAMP % inhibition at 10 ⁻⁵ M ^[c]
Ape13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	5.7 ± 0.3	1.89 ± 1	96.0 ± 1.8
1	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F	2.6 ± 0.3	14.8 ± 5	88.8 ± 1.3
2	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-(D)F	109 ± 16	--	94.8 ± 1.8
3	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-(D)P-F	44 ± 13	--	89.9 ± 1.3
4	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-(D)M-P-F	11 ± 2	--	88.0 ± 0.7
5	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-(D)P-M-P-F	1639 ± 283	--	87.6 ± 0.9
6	<Glu-R-P-R-L-S-H-(D)K-G-P-M-P-F	452 ± 119	--	90.0 ± 1.3
7	<Glu-R-P-R-L-S-(D)H-K-G-P-M-P-F	305 ± 64	--	89.1 ± 1.6
8	<Glu-R-P-R-L-(D)S-H-K-G-P-M-P-F	642 ± 118	--	88.5 ± 1.5
9	<Glu-R-P-R-(D)L-S-H-K-G-P-M-P-F	61 ± 10	--	88.6 ± 0.6
10	<Glu-R-P-(D)R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	1279 ± 271	--	88.4 ± 1.3
11	<Glu-R-(D)P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	3944 ± 545	--	84.4 ± 1.5
12	<Glu-(D)R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	4120 ± 672	--	85.5 ± 0.6
13	(D)<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	26 ± 3	--	90.2 ± 1.4

[a] Concentration producing 50% competitive inhibition of binding of apelin radioligand [¹²⁵I]-apelin13, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [b] Concentration producing 50% inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [c] % inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation at 10⁻⁵ M, values represent the mean of three determinations.

Every compound was tested in a 7-point curve radioligand binding assay to determine its IC₅₀ value, and in a cyclic adenosine monophosphate (cAMP) accumulation assay at a single concentration of 10 μM to confirm its agonist activity. First, single substitution of Pro¹², Met¹¹, Leu⁵ and Pyr¹ by their D-analogs (**3**, **4**, **9**, and **13**, respectively) resulted in mild decrease in binding compared to the native peptide Pyr¹-apelin-13 (**Ape13**). These results suggest that the residue Pro¹² is likely not critical to impose rigidity on the C-

terminal end of the peptide. While results on Met¹¹ and Pyr¹ confirm their limited role for receptor interaction as previously reported with the Ala scan ^[26], inversion of configuration on residues Leu⁵ and Phe¹³ led to a modest decrease in binding (**9** and **2**, IC₅₀ 61 and 109 nM, respectively) compared to Pyr¹-apelin-13 (IC₅₀ 5.7 nM). In contrast, inversion of configuration on the central amino acids Ser⁶, His⁷ and Lys⁸ induced a significant 50- to 100-fold decrease in binding (analogs **6**, **7**, **8**). These results, which contrast with those of the Ala scan ^[26], suggest that although side chains of Ser⁶-His⁷-Lys⁸ may not interact directly with the receptor, inversion of their configuration possibly changes the basal conformation of the peptide and imposes a rearrangement of the skeleton upon binding, accompanied by a significant entropic penalty ^[38]. Unlike Pro¹², the inversion of configuration of Pro¹⁰ decreased binding by more than 2 orders of magnitude (**5**, IC₅₀ 1.6 μM), suggesting a role in structuring the peptide. We also observed an important loss of affinity for (D)Pro³ analog **11**, suggesting a critical role in structuring the chain ^[31]. Finally, as expected, inversion of configuration of Arg⁴ and Arg² impaired binding dramatically (**10** and **12**; IC₅₀ 1.3 and 4.1 μM, respectively), with a greater impact on Arg², consistent with the Ala scan ^[26]. Similar to Pyr¹-apelin-13, all of these new apelin analogs behaved as full agonists at APJ receptors (G_{i/o} pathway), inhibiting forskolin-induced cAMP accumulation by 85-95 % at a single concentration of 10 μM.

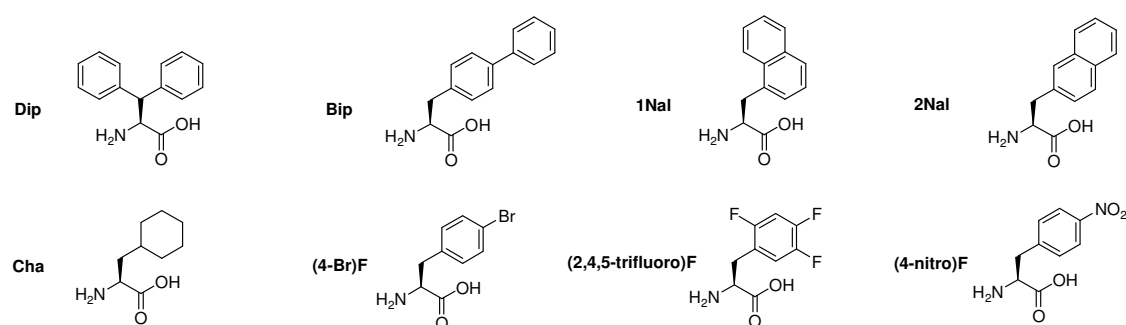
C-terminal substitutions

The C-terminal Phe¹³ of apelin-13 appears to have a pivotal role in the SAR with the APJ receptor. Indeed, truncation or replacement by Ala of the C-terminal Phe residue yields a peptide able to modify the properties of receptor internalization ^[36, 39]. Furthermore, the Ala scan ^[26] or the D-scan reported here demonstrated that deletion or substitution of Phe¹³ leads to approximately a 10-fold decrease in binding and functional efficacy (G_{i/o} pathway). With this in mind, we replaced Phe¹³ by unnatural amino acids to further explore SAR locally [**Table 2**, **Figure 2**]. This set of modifications was performed on the Met11Nle analog to circumvent oxidation side products frequently associated with the presence of Met in peptides ^[40]. The Met11Nle analog (**1**, IC₅₀ 2.6 nM) possesses a similar profile in terms of affinity, coupling to second messenger cascades, and stability to that of Pyr¹-apelin-13 (IC₅₀ 5.7 nM).

Table 2. C-terminal residue substitutions, binding affinity, functional assays and plasma stability.

N°	Sequence	Binding	Functional assays			% remaining after ^[e]		
			IC ₅₀ (nM) ^[a]	EC ₅₀ cAMP (nM) ^[b]	cAMP % inhibition at 10 ⁻⁵ M ^[c]	EC ₅₀ β-arrestin2 (nM) ^[d]	1h	2h
Ape13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	5.7 ± 0.3	1.9 ± 1	96.0 ± 1.8	91 ± 17	27	6	0
1	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F	2.6 ± 0.3	14.8 ± 5	88.8 ± 1.3	--	25	5	0
14	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Dip	88 ± 6	--	93.9 ± 1.9	630 ± 179	71	58	49
15	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bip	7.8 ± 0.4	10.3 ± 3	88.0 ± 1.4	361 ± 64	67	24	5
16	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-1Nal	14.1 ± 0.9	28.6 ± 2	94.4 ± 1.2	522 ± 110	65	59	38
17	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-2Nal	1.2 ± 0.1	20.5 ± 6	90.7 ± 2.1	70 ± 11	84	35	6
18	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Cha	2.3 ± 0.6	19.9 ± 8	95.2 ± 0.9	170 ± 32	65	50	30
19	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-W	8.5 ± 0.2	--	58.5 ± 1.2	293 ± 64	21	5	0
20	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-Br)F	1.2 ± 0.1	12.4 ± 3	90.6 ± 1.6	28 ± 8	47	17	2
21	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(2,4,5-trifluoro)F	0.83 ± 0.2	20.4 ± 9	95.1 ± 2.1	32 ± 9	35	12	5
22	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-nitro)F	2.6 ± 0.3	9.8 ± 2	89.4 ± 1.8	53 ± 15	35	15	0

[a] Concentration producing 50% competitive inhibition of binding of apelin radioligand [¹²⁵I]-apelin13, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [b] Concentration producing 50% inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [c] % inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation at 10⁻⁵ M, values represent the mean of three determinations. [d] Concentration producing 50% activation of the β-arrestin2 pathway as observed in the BRET assay, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations [e] Values represent the mean of two determinations after 1h, 2h and 3h of incubation in rat plasma and are calculated by doing the ratio between surface areas of reference standard Fmoc-Gly and compound signals by HPLC/UV (214 nm).

**Figure 2.** Unnatural amino acids used for replacement of the C-terminal Phe13 residue to further explore local SAR.

Aromatic interactions have been proposed as critical determinants of receptor internalization^[36]. This observation has direct consequences on the physiological activity of APJ and other GPCRs^[39]. Given the proposal that several aromatic residues interact with the terminal Phe of apelin-13 (Trp¹⁵², Trp²⁵⁹ and Phe²⁵⁵) in the transmembrane domain^[36], Phe¹³ was replaced by the unnatural amino acids, diphenylalanine (Dip) and biphenylalanine (Bip), which possess increased capacity for π - π interactions and could be used to probe the binding pocket. Phe13Dip (**14**, IC₅₀ 88 nM) and Phe13Bip (**15**, IC₅₀ 7.8 nM) display a 10-fold difference in affinity. Given the rigid positioning of aromatic groups on these unnatural amino acids, these results suggest that the C-terminal binding site is deep rather than wide. Interestingly, Phe13Cha (**18**, IC₅₀ 2.3 nM) possesses an affinity comparable to that of Pyr¹-apelin-13, indicating that hydrophobic interactions are necessary for binding, but aromatic, π -stacking type interactions are not essential.

Accordingly, Phe13-1Nal (**16**, IC₅₀ 14.1 nM) and Phe13-2Nal (**17**, IC₅₀ 1.2 nM) showed a 10-fold difference in favor of the 2Nal analog. The similarity with Phe13Trp (**19**, IC₅₀ 8.5 nM) suggests that additional H-bonding and/or increased electron density^[41] could be detrimental for affinity. The result with 1Nal is consistent with that of Phe13Trp, since 1Nal is considered a bioisosteric replacement for Trp^[42]. On the other hand, electron-poor analogs (4-Br)Phe **20**; (2,4,5-trifluoro)Phe **21** and (4-nitro)Phe **22** all demonstrated improved binding compared to Phe, particularly **21** which possesses sub-nM affinity (0.8 nM). Altogether, the above results suggest that, despite not being a prerequisite, there is a possibility of π -stacking interaction with electron-rich residues^[36] in the binding pocket of APJ, which is more favorable with electron-poor residues on apelin (to be noted the (2,4,5-trifluoro)Phe is the poorest of the aforementioned^[43]).

All C-terminal analogs showed similar agonist profiles (EC₅₀ 10-20 nM) in the cAMP accumulation assay when compared to Pyr¹-apelin-13 (EC₅₀ 1.9 nM), except for Phe13Trp (**19**, 58.5% inhibition). In the β -arrestin2 assay, we observed an interesting trend between Phe13-1Nal (**16**, EC₅₀ 522 nM) and Phe13-2Nal (**17**, EC₅₀ 70 nM), showing the possibility of a particular C-terminal pocket occupation for β -arrestin2 activation. Consistently with the binding assay, electron-poor analogs **20** (EC₅₀ 28 nM), **21** (EC₅₀ 32 nM) and **22** (EC₅₀ 53 nM) provided higher efficacy in the β -arrestin2 assay compared to Pyr¹-apelin-13 (EC₅₀ 91 nM). Altogether, these results reinforce previous findings^[36, 39] indicating the

implication of the C-terminal residue in APJ receptor internalization. The stability of the newly synthesized analogs was further evaluated *in vitro* in rat plasma and compared to that of Pyr¹-apelin-13. In general, C-terminal substitutions provided significant improvements in plasma stability especially for analogs presenting increased steric hindrance (analogs **14**, **15**, **16**, **17**).

Pro¹² substitutions

Apelin-13 stability is low in human plasma ($t_{1/2} \sim 1$ min) [37]. The critical step in apelin stability *in vivo* has been attributed to hydrolysis by the angiotensin-converting-enzyme 2, which cleaves the hormone between residues Pro¹² and Phe¹³ [37]. Thus, in order to both better understand SAR and potentially improve plasma stability, we synthesized several analogs in which Pro¹² was replaced by unnatural amino acids providing different steric or conformational environment [Table 3, Figure 3].

Replacement of Pro¹² by aminoindane (**27**, IC₅₀ 20 nM) and Tle (**31**, IC₅₀ 15.6 nM) mildly decreased affinity, possibly due to changes in local conformation. Surprisingly, replacement of Pro¹² by the γ -amino isonipecotic acid (**30**, IC₅₀ 5.0 nM) did not affect affinity. Importantly, replacement of Pro¹² by Aib (aminoisobutyric acid (**24**, **29**)) provided a very potent analog, with an IC₅₀ of 0.76 nM, almost 10-fold better than Pyr¹-apelin-13. The absence of substantial impacts on affinity suggests that substitution of Pro¹² with unnatural residues or D-analogs is not critical for positioning the terminal Phe residue. However, combination of the 2Nal¹³ and Aib¹² modifications did not provide the expected synergy in terms of affinity (**32**, IC₅₀ 3.6 nM). Deletion of the Pyr¹Arg² (**33**, IC₅₀ 2928 nM) and Pyr¹Arg²Pro³ (**34**, IC₅₀ 3453 nM) segments altogether was very detrimental to binding. However, all these truncated analogs preserved their agonist profile on the G_{i/o} pathway ($\sim 90\%$ cAMP inhibition) but not on the β -arrestin2 pathway (>3000 nM), suggesting that the distance between the two epitopes may be important for receptor endocytosis and trafficking. As a matter of fact, the apelin-13 internalized receptor is rapidly recycled to the cell surface, whereas the apelin-36 internalized receptor is addressed to intracellular compartment [30]. Others analogs of this series kept their agonist profile, with less than 10-fold difference compared to Pyr¹-apelin-13, except for Pro¹²aminoindane (**27**, 53.3 % cAMP inhibition, EC₅₀ β -arr2 1.2 μ M). Surprisingly, Pro¹² substitutions generally did not

increase stability (**24** vs **30**). Analog **24**, which possesses a 10-fold increased affinity, is also significantly more stable in plasma than Pyr¹-apelin-13. Again, the combination of 2Nal¹³ and Aib¹² (**32**) substitution affected stability. Pro12cycloleucine **28** and truncated analogs **33**, **34** were completely degraded after 1 h.

N°	Sequence	Binding IC ₅₀ (nM) ^[a]	Functional assays			% remaining after ^[e]		
			EC ₅₀ cAMP (nM) ^[b]	cAMP % inhibition at 10 ⁻⁵ M ^[c]	EC ₅₀ β-arrestin2 (nM) ^[d]	1h	2h	3h
Ape13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	5.7 ± 0.3	1.89 ± 1	96.0 ± 1.8	91 ± 17	27	6	0
1	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F	2.6 ± 0.3	14.8 ± 5	88.8 ± 1.3	--	25	5	0
23	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M- N-Me-Ala -F	3.4 ± 0.2	10.0 ± 3	90.1 ± 1.1	114 ± 23	18	0	0
24	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M- Aib -F	0.76 ± 0.1	30.0 ± 13	89.9 ± 1.6	46 ± 10	49	18	12
25	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M- HoPro -F	11.3 ± 2.0	11.6 ± 3	91.5 ± 1.9	453 ± 115	46	12	0
26	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Acpc -F	2.4 ± 0.4	20.1 ± 4	92.4 ± 0.9	118 ± 23	20	3	0
27	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Aminoindane -F	20 ± 1.1	--	53.3 ± 1.5	1204 ± 208	57	44	30
28	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- cycloleucine -F	1.6 ± 0.2	--	82.7 ± 0.8	320 ± 43	0	0	0
29	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Aib -F	1.8 ± 0.2	20.9 ± 7	89.8 ± 1.4	34 ± 7	45	13	6
30	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Inp -F	5.0 ± 0.9	--	88.5 ± 1.5	42 ± 8	47	32	31
31	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Tle -F	15.6 ± 2.0	--	73.0 ± 1.1	95 ± 19	61	38	26
32	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Aib-2Nal	3.6 ± 1.0	12.3 ± 3	91.1 ± 1.9	38 ± 7	24	14	7
33	Ac -P-R-L-S-H-K-G-P-Nle- Aib-2Nal	2928 ± 766	--	88.4 ± 1.4	>4000	0	0	0
34	Ac -R-L-S-H-K-G-P-Nle- Aib-2Nal	3453 ± 989	--	92.6 ± 1.4	>3000	0	0	0

[a] Concentration producing 50% competitive inhibition of binding of apelin radioligand [¹²⁵I]-apelin13, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [b] Concentration producing 50% inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [c] % inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation at 10⁻⁵ M, values represent the mean of three determinations. [d] Concentration producing 50% activation of the β-arrestin2 pathway as observed in the BRET assay, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [e] Values represent the mean of two determinations after 1h, 2h and 3h of incubation in rat plasma and are calculated by doing the ratio between surface areas of reference standard Fmoc-Gly and compound signals by HPLC/UV (214 nm).

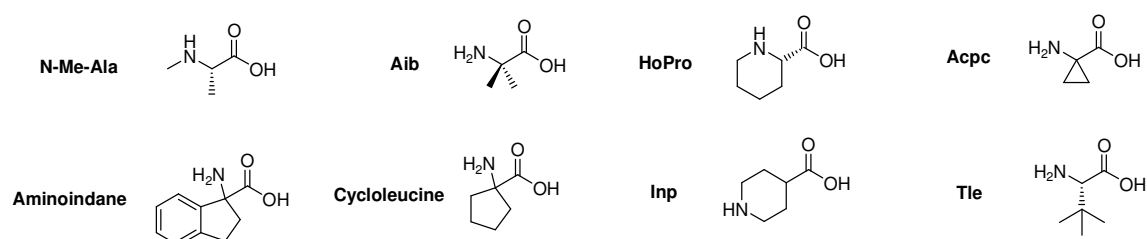


Figure 3. Unnatural amino acids used to replace the Pro12 residue.

The four analogs were associated with important reductions in affinity. It has been previously described ^[32] that a hydrogen bond is formed between Ser⁶ side chain and the Leu⁵ backbone carbonyl, stabilizing the Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷ β -turn, which is absent in the four analogs and could partially explain the drop in affinity. For PEG₄ (**35**, IC₅₀ 450 nM) and PEG₆ (**36**, IC₅₀ 13.7 μ M) analogs, affinity decreased by 80- and more than 2000-fold respectively, whereas replacement of the central segment by (Ala)₄ (**38**, IC₅₀ 3.7 μ M) led to a 500-fold decrease in affinity. The fact that the PEG₄ analog possessed higher affinity compared to the (Ala)₄ analog suggests that a flexible backbone is preferable, independently of direct molecular interactions with the receptor. Indeed, poly(alanine) are known to induce helical conformations ^[44]. Surprisingly, truncation of the central four amino acids did not result in complete loss of affinity (**37**, IC₅₀ = 5.4 μ M). However, it underlines the importance of the two epitopes of the peptide for binding, in agreement with the proposed pharmacophore model ^[35].

Functionally, this latter series of analogs was not very efficacious at activating the G_i pathway. Indeed, **35** – **38** inhibited cAMP accumulation by only 10-22% at 10 μ M. These analogs seem to behave as antagonists, which will be further investigated. Analogs with modifications to the central portion (**35**, **36**, **37**, **38**) possessed improved plasma stability, possibly due to changes in conformation and replacement of peptidic backbones by PEGs.

Conclusion

In conclusion, this study refines existing SAR of the apelin hormone and opens interesting avenues for future work. It demonstrates that the spatial orientation of some residues of the apelin peptide is important, despite little effect in the alanine scan. It also underlines the critical importance of Arg², Pro³, Arg⁴ and the lesser role of Pro¹². With the help of selected unnatural amino acids, we also studied SAR on the C-terminal end of the peptide via binding and agonist profiling on two pathways (G_{i/o}, β -arrestin2), by substituting Phe¹³ with different types of aromatics. It led to better delineation of the shape of the C-terminal pocket, demonstrating the possibility of hydrophobic, non-aromatic interactions, and confirming the interaction of the C-terminal Phe with electron-rich residues in the binding pocket of the APJ receptor. Central amino acids were also substituted by various linkers (PEGs, Alanine), demonstrating the importance of distance and rigidity between the two

epitopes. Substitutions of Pro¹² with amino acids inducing variable steric hindrance were generally well tolerated. The plasma stability of new analogs was assessed. C-terminally and centrally modified analogs showed significant improvements plasma stability compared to Ape13, whereas analogs modified at Pro¹² displayed more variable results. This study also reports a series of peptide agonists of the APJ receptor with higher affinity and plasma stability than Pyr¹-apelin-13. It opens a number of new avenues, which are under investigation and will be reported in due course.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from Université de Sherbrooke, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Collaborative Research & Development Grant with Tranzyme Pharma) and Tranzyme Pharma Inc. is gratefully acknowledged. Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS) is also acknowledged for scholarship to A.M. and E.B.-O. P.S. is the recipient of an FRSQ Junior 2 salary support. Pr G. Guillemette and L. Gendron are gratefully acknowledged for providing lab space and equipment for biological assays.

MATERIALS AND METHODS

Procedures for solid phase synthesis

Materials

Protected amino acids, TentaGel S PHB Phe Fmoc resin and TentaGel S PHB, O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]polyethylene glycol resin were purchased from ChemImpex International (USA) and Rapp Polymere (Germany). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Canada), Fisher Scientific (USA) or ACP (Canada) and were of the highest commercially available purity. Peptide synthesis was performed in 12 mL polypropylene cartridge with 20 μ PE frit from Applied Separations (USA).

Analogues with phenylalanine as C-terminal amino acid

Tentagel S PHB Phe Fmoc resin (0.25 mmol/g, 0.3 g) was treated with 20% piperidine/DMF (*N,N*-dimethylformamide) during 30 min and reacted with a Fmoc N-protected amino acid (5 equiv.) in the presence of [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] HATU (5 equiv.), *N,N*-diisopropylethylamine (10 equiv.) in DMF (4 mL). The coupling reaction time was 1 h at room temperature (generally sufficient to obtain complete coupling as judged by the Kaiser test ^[45]) and piperidine (20% in DMF) was used to cleave the Fmoc group at every step. The resin was washed after each coupling step and deprotection by shaking 5 min in DMF (2x 5 mL), 2-propanol (1x 5 mL), DCM (1x 5 mL), 2-propanol (1x 5 mL), DCM (1x 5 mL), DMF (2x 5 mL). For resin cleavage, the resin was treated with a mixture of TFA (trifluoroacetic acid)/H₂O/TIPS (Triisopropylsilane), 95/5/5, v/v] (4 mL / 0.3 g of resin) for 4 h at room temperature. After filtration of the resin, peptide was precipitated in TBME (*Tert*-butyl methyl ether) at 0°C, the suspension was centrifuged, the supernatant was removed and the crude product was redissolved in water then lyophilized. Purification by reverse-phase chromatography (described below) yielded the desired products as white powders after lyophilization.

Analogues with a different C-terminal amino acid than phenylalanine

Coupling of the terminal amino acid to the resin, TentaGel S PHB, O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]polyethylene glycol resin (0.27 mmol/g, 0.3 g) was treated with triphenylphosphine (7.4 equiv.), diisopropyl azodicarboxylate (DIAD, 7.4 equiv.), Fmoc protected amino acid (7.4 equiv.) and tetrahydrofuran (THF, 4 mL) as solvent. The reaction was run overnight at room temperature, then the resin was washed for 5 min with DCM (2x 5 mL), toluene (1x 5 mL), EtOH (1x 5 mL), toluene (1x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 1x 5 mL), THF/MeOH (75/25, 1x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 1x 5 mL), THF/MeOH (75/25, 1x 5 mL), DCM (2x 5 mL). The resin was then treated with DCM/Ac₂O/DIPEA (20/5/1, v/v/v, 5 mL) at room temperature during 1h, and washed with DCM (3x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 5 mL), DCM (3x 5 mL). The rest of the synthesis was pursued as indicated above.

Peptide purification and characterization

Crude peptides were purified by reverse-phase chromatography using an ISCO CombiFlash Sq16x system with a Silicycle C₁₈ column (12 g, 60 Å, 40-63 µm spherical particle size column) and a linear gradient of 5-30% acetonitrile in water containing 0.1% TFA over 60 min. Analytical HPLC analyses were performed on an Agilent 1100 series equipped with UV detector set at 223 nm and an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (3.0 x 50 mm, 1.8 µm spherical particle size column). The gradient was 2-50% acetonitrile in water containing 0.1% TFA (10 min), 50-100% (4 min), 100% (4 min), 100-2% (1 min) and 2% (3 min). Most analogues possessed UV purity >95% at 223 nm. Molecular weights of compounds were determined by mass spectrometry (Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters).

Binding and cAMP accumulation assays

Materials

High glucose Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), G418 and penicillin/streptomycin were purchased from Invitrogen Life Technologies (Canada). Fetal bovine serum (FBS) and Hank's balanced saline solution (HBSS) were purchased from

Wisent (Canada). 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl_2), magnesium chloride (MgCl_2), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), glucose, sodium bicarbonate (NaHCO_3), sodium hydroxide (NaOH) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from BioShop (Canada). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), imidazole and forskolin were purchased from Sigma-Aldrich (Canada). Sodium chloride (NaCl) and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Fisher Scientific (Canada). Hydrochloric acid (HCl) was purchased from Anachemia Science (Canada). [^3H]-adenine and [^{125}I]-apelin13 were purchased from PerkinElmer (Canada). Polyethylenimine (branched PEI) was obtained from Polysciences (USA). Coelenterazine-400A (DeepBlueC) was purchased from Biosynth International Inc. (USA). White opaque 96-well half area plates were obtained from Perkin Elmer (Canada). BRET2 measurements were performed on an M1000 plate reader from Tecan (USA).

Cell culture

Stable cell lines expressing the YFP epitope-tagged human APJ receptor (HEK 293 cells) were cultured in high glucose Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were kept in a humidified atmosphere with 5% CO_2 at 37°C according to the manufacturer's instructions. Three to four days before the assay, cells were plated in 35 mm culture dishes and used at 80% confluence. G418 and penicillin/streptomycin were used as selection agent and antibiotics, respectively.

Membrane preparation

Binding experiments were carried out on freshly prepared membrane homogenates. Briefly, 24 h after plating confluent HEK-293 cells were scraped off the culture dishes with 50 mM ice-cold Tris-HCl buffer, pH 7.5. Subsequently, the cells were centrifuged at 13000 rpm for 5 min at 4°C in microcentrifuge tubes and resuspended in hypotonic TE buffer (5 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5). Membrane homogenates were then sonicated,

recentrifuged at 13000 rpm for 30 min at 4°C and finally resuspended in the same TE buffer.

Radioligand binding experiments

Competition radioligand binding experiments were performed by incubating cell membranes (50 µg) with 0.2 nM [¹²⁵I]-Apelin-13 (2200 ci/mmol) and increasing concentrations of various apelin analogs (10⁻¹¹ to 10⁻⁵ M) for 30 min at 25°C in 250 µL binding buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.2% bovine serum albumin). Incubations were terminated by addition of 2 mL ice-cold binding buffer followed by filtration through glass microfiber filters (GF/C, Whatman) pre-incubated overnight with 0.5% polyethylenimine in binding buffer. After washing twice with 2 mL ice-cold binding buffer, the radioactivity retained on the filter was counted in a γ-counter 1470 Wizard form Perkin Elmer (75% counting efficiency). Nonspecific binding was measured in the presence of 10⁻⁵ M unlabeled Pyr¹-apelin-13 and represented less than 5% of total binding. IC₅₀ values were determined from inhibition curves as the unlabeled ligand concentration inhibiting 50% of [¹²⁵I]-Apelin13 specific binding. All binding data were calculated and plotted using Graphpad Prism 5 and represent the mean ± S.E.M. of three determinations.

Measurement of cAMP production

Intracellular cAMP production was determined by measuring the conversion of [³H]ATP to [³H]cAMP, as previously described [46, 47], on cells plated in 35 mm culture dishes. Cells were incubated for 1 h at 37°C with complete culture medium containing 2 µCi/ml of [³H]-adenine. Cells were then washed and incubated for 15 min in 1 mM IBMX in Hank's balanced solution (HBS, pH 7.4) containing 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₃, as well as 5 nM HEPES, supplemented with 1 g/L glucose. Following the first incubation, analogs were added to the incubation medium for 15 min at 37°C. Separation of [³H]ATP from [³H]cAMP was obtained by chromatography on Dowex and alumina columns, as described previously [48]. cAMP formation was calculated as follows: % conversion = [³H]cAMP / ([³H]cAMP + [³H]ATP) x 100/15 min. Inhibition of conversion by the ligand was calculated as follows: % inhibition = ([% conversion_{sample} - % conversion_{positive control}] / [% conversion_{negative control} - % conversion_{positive}])

control] $\times 100$. All analogs were tested at a single concentration of 1 μM , to confirm agonist activity. On selected agonists, EC_{50} was determined by measurements at 10^{-11} to 10^{-6} M. Data were calculated and plotted using Graphpad Prism 5 and represent the mean \pm S.E.M. of three determinations.

β -arrestin2 assays

Plasmid expression

β -arrestin2-RlucII expression vector and the fusion vector pIREShygro3-GFP10 were kindly provided by Dr. Michel Bouvier (Dpt of Biochemistry, Université de Montréal). To construct the APJ-GFP10 plasmid, the complete coding sequence of the human apelin receptor was PCR amplified without its stop codon from plasmid template and then fused at C-terminus, in frame to the coding sequence of GFP10 in pIREShygro3 with InFusion advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Cell culture and plasmid transfections

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin-streptomycin, and 2 mM L-glutamine at 37° C in a humidified chamber at 5% CO_2 . For transient expression of recombinant proteins, 10 cm dishes were seeded with 2,000,000 HEK293 cells. Approximately 18 h later, the cells were transfected using PEI^[49].

BRET assays on cells in suspension

For the BRET2- β -arrestin2 recruitment assays, cells co-expressing β -arrestin2-RlucII and APJ-GFP10 were washed once with Hank's balanced salt solution (HBSS), detached by gentle pipetting in HBSS, and dispensed into 96-well half area white opaque plates at a density of $\sim 50,000$ cells/well. Analogs were added for 20 minutes followed by coelenterazine-400A (5 μM final concentration, Biosynth International Inc., Itasca, IL). The BRET2 ratio was determined as emission at 515 nm/400 nm using the BRET2 filters set of the M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC). EC_{50} was determined by measurements at

10^{-10} to 10^{-5} M. Data were calculated and plotted using Graphpad Prism 5 and represent the mean \pm S.E.M. of three determinations.

Plasma stability

27 μ L of rat plasma (obtained from rat blood by keeping the translucent phase after centrifugation at 13000 rpm during 5 min at 4°C) and 6 μ L of a 1 mM aqueous solution of analog were incubated at 37°C for 1h, 2h and 3h. The reaction was stopped by adding 70 μ L of acetonitrile. After vortexing and centrifugation at 13000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant was analyzed by HPLC-UV (223 nm). To quantify the degradation of analogs, 6 μ L of a 1 mM aqueous solution of Fmoc-Glycine was added in each sample as a reference standard just before the HPLC analysis. The percentage of remaining compound (not degraded) was calculated by doing the ratio between the AUC (area under the curve) of Fmoc-Gly and AUC of the test compound.

REFERENCES

- [1] B.F. O'Dowd, M. Heiber, A. Chan, H.H. Heng, L.C. Tsui, J.L. Kennedy, X. Shi, A. Petronis, S.R. George, T. Nguyen, *Gene* **1993**, *136*, 355-360.
- [2] K. Tatemoto, M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M.X. Zou, Y. Kawamata, S. Fukusumi, S. Hinuma, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda, M. Fujino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471-476.
- [3] J. Berta, I. Kenessey, J. Dobos, J. Tovari, W. Klepetko, H. Jan Ankersmit, B. Hegedus, F. Renyi-Vamos, J. Varga, Z. Lorincz, S. Paku, G. Ostoros, A. Rozsas, J. Timar, B. Dome, *J. Thorac. Oncol.* **2010**, *5*, 1120-1129.
- [4] L. Bodineau, A. Hus-Citharel, C. Llorens-Cortes, *Ann. Endocrinol. (Paris)* **2010**, *71*, 249-256.
- [5] C.J. Charles, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2007**, *5*, 1-10.
- [6] N. De Mota, Z. Lenkei, C. Llorens-Cortes, *Neuroendocrinology* **2000**, *72*, 400-407.
- [7] N. De Mota, A. Reaux-Le Goazigo, S. El Messari, N. Chartrel, D. Roesch, C. Dujardin, C. Kordon, H. Vaudry, F. Moos, C. Llorens-Cortes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10464-10469.
- [8] C. Dray, C. Debard, J. Jager, E. Disse, D. Daviaud, P. Martin, C. Attane, E. Wanecq, C. Guigne, F. Bost, J.F. Tanti, M. Laville, H. Vidal, P. Valet, I. Castan-Laurell, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *298*, E1161-9.
- [9] A.G. Japp, D.E. Newby, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1882-1892.
- [10] D.K. Lee, S.R. George, B.F. O'Dowd, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 190-194.
- [11] A.M. O'Carroll, T.L. Selby, M. Palkovits, S.J. Lolait, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1492*, 72-80.
- [12] G. Wang, Y. Anini, W. Wei, X. Qi, A.M. OCarroll, T. Mochizuki, H.Q. Wang, M.R. Hellmich, E.W. Englander, G.H. Greeley Jr, *Endocrinology* **2004**, *145*, 1342-1348.
- [13] C. Dray, C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P.D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpene, R. Burcelin, I. Castan-Laurell, P. Valet, *Cell. Metab.* **2008**, *8*, 437-445.
- [14] Y. Horiuchi, T. Fujii, Y. Kamimura, K. Kawashima, *J. Neuroimmunol.* **2003**, *144*, 46-52.
- [15] B. Chandrasekaran, P.R. Kalra, J. Donovan, J. Hooper, J.R. Clague, T.A. McDonagh, *J. Card. Fail.* **2010**, *16*, 556-561.

- [16] X.F. Fan, Q. Wang, S.Z. Mao, L.G. Hu, L. Hong, L.X. Tian, Y.Q. Gao, Y.S. Gong, *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* **2010**, 26, 9-12.
- [17] M.V. Heinonen, A.K. Purhonen, P. Miettinen, M. Paakkonen, E. Pirinen, E. Alhava, K. Akerman, K.H. Herzig, *Regul. Pept.* **2005**, 130, 7-13.
- [18] A.G. Japp, N.L. Cruden, D.A. Amer, V.K. Li, E.B. Goudie, N.R. Johnston, S. Sharma, I. Neilson, D.J. Webb, I.L. Megson, A.D. Flapan, D.E. Newby, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, 52, 908-913.
- [19] D.K. Lee, S.R. George, B.F. O'Dowd, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, 27, 190-194.
- [20] C. Llorens-Cortes, A. Beaudet, *Med. Sci. (Paris)* **2005**, 21, 741-746.
- [21] Y.P. Visser, F.J. Walther, H. Laghmani el, A. Laarse, G.T. Wagenaar, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, 182, 1239-1250.
- [22] N. Xu, H. Wang, L. Fan, Q. Chen, *Peptides* **2009**, 30, 1153-1157.
- [23] X. Fan, N. Zhou, X. Zhang, M. Mukhtar, Z. Lu, J. Fang, G.C. DuBois, R.J. Pomerantz, *Biochemistry* **2003**, 42, 10163-10168.
- [24] X.J. Zeng, L.K. Zhang, H.X. Wang, L.Q. Lu, L.Q. Ma, C.S. Tang, *Peptides* **2009**, 30, 1144-1152.
- [25] S.L. Pitkin, J.J. Maguire, T.I. Bonner, A.P. Davenport, *Pharmacol. Rev.* **2010**, 62, 331-342.
- [26] A.D. Medhurst, C.A. Jennings, M.J. Robbins, R.P. Davis, C. Ellis, K.Y. Winborn, K.W. Lawrie, G. Hervieu, G. Riley, J.E. Bolaky, N.C. Herrity, P. Murdock, J.G. Darker, *J. Neurochem.* **2003**, 84, 1162-1172.
- [27] P. Yue, H. Jin, S. Xu, M. Aillaud, A.C. Deng, J. Azuma, R.K. Kundu, G.M. Reaven, T. Quertermous, P.S. Tsao, *Endocrinology* **2011**, 152, 59-68.
- [28] B. Masri, L. van den Berghe, C. Sorli, B. Knibiehler, Y. Audigier, *J. Soc. Biol.* **2009**, 203, 171-179.
- [29] I. Szokodi, P. Tavi, G. Földes, S. Voutilainen-Myllylä, M. Ilves, H. Tokola, S. Pikkarainen, J. Rysä, M. Tóth, H. Ruskoaho, *Circ. Res.* **2002**, 91, 434-440.
- [30] D.K. Lee, S.S. Ferguson, S.R. George, B.F. O'Dowd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 395, 185-189.
- [31] D.N. Langelan, E.M. Bebbington, T. Reddy, J.K. Rainey, *Biochemistry* **2009**, 48, 537-548.

- [32] N.J. Macaluso, R.C. Glen, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1247-1253.
- [33] N.J. Macaluso, S.L. Pitkin, J.J. Maguire, A.P. Davenport, R.C. Glen, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1017-1023.
- [34] J. Hamada, J. Kimura, J. Ishida, T. Kohda, S. Morishita, S. Ichihara, A. Fukamizu, *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 547-552.
- [35] X. Iturrioz, R. Alvear-Perez, N. De Mota, C. Franchet, F. Guillier, V. Leroux, H. Dabire, M. Le Jouan, H. Chabane, R. Gerbier, D. Bonnet, A. Berdeaux, B. Maigret, J.L. Galzi, M. Hibert, C. Llorens-Cortes, *FASEB J.* **2010**, *24*, 1506-1517.
- [36] X. Iturrioz, R. Gerbier, V. Leroux, R. Alvear-Perez, B. Maigret, C. Llorens-Cortes, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 32627-32637.
- [37] C. Vickers, P. Hales, V. Kaushik, L. Dick, J. Gavin, J. Tang, K. Godbout, T. Parsons, E. Baronas, F. Hsieh, S. Acton, M. Patane, A. Nichols, P. Tummino, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14838-14843.
- [38] K. Janek, J. Behlke, J. Zipper, H. Fabian, Y. Georgalis, M. Beyermann, M. Bienert, E. Krause, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8246-8252.
- [39] S. El Messari, X. Iturrioz, C. Fassot, N. De Mota, D. Roesch, C. Llorens-Cortes, *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 1290-1301.
- [40] W. Vogt, *Free Radicals Biol. Med.* **1995**, *18*, 93-105.
- [41] C. Ruan, M.T. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14600-14610.
- [42] J.E. Robbers, S. Srikrai, H.G. Floss, *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 178-181.
- [43] M. Salomon, A. Jimenez, I. Salazar, R. Zawadzki, *J. Chem. Ed.* **1973**, *50*, 370-371.
- [44] C. Wei, D. Tung, Y.M. Yip, Y. Mei, D. Zhang, *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 171101.
- [45] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Bioch.* **1970**, *34*, 595.
- [46] N. Gallo-Payet, M.D. Payet, *J. Endocrinol.* **1989**, *120*, 409-421.
- [47] Z. Kilianova, N. Basora, P. Kilian, M.D. Payet, N. Gallo-Payet, *Endocrinology* **2006**, *147*, 2325-2337.
- [48] Y. Salomon, C. Londos, M. Rodbell, *Anal. Biochem.* **1974**, *58*, 541-548.
- [49] C. Ehrhardt, M. Schmolke, A. Matzke, A. Knoblauch, C. Will, V. Wixler, S. Ludwig, *Signal Transduction* **2006**, *6*, 179-184.

ARTICLE 2

Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid

Auteurs de l'article: Alexandre Murza, Karine Belleville, Jean-Michel Longpré, Philippe Sarret, Éric Marsault

Statut de l'article: Publié dans *Biopolymers*, **2014**, 102(4), 297-303.

Avant-propos: J'ai réalisé toute l'étude au complet, excepté pour le volet *in vivo*, injections des composés et prélèvements de sang de l'animal, qui a nécessité le concours de Karine Belleville, technicienne en santé animale. J'ai écrit la première version du manuscrit.

Cet article contribue à répondre à l'objectif 4).

Note: Les chromatogrammes et les spectres de masse des analogues faisant partie du matériel supplémentaire seront présentés en annexe à la fin de manuscrit.

Résumé: L'apéline est le ligand endogène du récepteur couplé aux protéines G (RCPG) de classe A, APJ. Le système apéline-APJ est localisé dans les tissus périphériques principalement au niveau du cœur, des reins, du poumon et du système gastro-intestinal. En effet, le complexe apélinergique a été décrit comme étant impliqué dans divers processus physiologiques tels que la régulation hydrique, le système cardiovasculaire et la sensibilité à l'insuline. La Pyr¹-apéline-13, souvent nommée plus simplement apéline-13, est l'isoforme majoritairement présent dans le plasma humain. Toutefois, sa stabilité protéolytique et son profil de dégradation restent encore peu connus. Le but de cette étude a été d'identifier les principaux sites de clivages de la Pyr¹-apéline-13 *in vitro* dans divers types de plasma (rat, souris, humain) ainsi que dans du liquide céphalo-rachidien de rat, puis *in vivo* après administration par voie intraveineuse chez le rat. Puis, les résidus clés ont été substitué par des acides aminés naturels et non-naturels afin d'évaluer l'impact sur la stabilité et le profil de dégradation protéolytique. Nos résultats mettent en évidence que le lien peptidique Leu⁵-Ser⁶ de la Pyr¹-apéline-13 est le premier site de clivage dans tous les types de plasma. Des résultats préliminaires suggèrent qu'une ou plusieurs métalloprotéases en seraient responsables. Bien que l'hydrolyse du lien Pro¹²-Phe¹³, précédemment décrit comme étant opérée par l'ACE-2, n'ait pas été observée, le remplacement de la Phe¹³ par des acides aminés non-naturels entraîne une augmentation de la demi-vie plasmatique allant jusqu'à un facteur 10. *In vivo*, le clivage majoritaire se situe au niveau de la liaison Pro¹⁰-Met¹¹, tandis que celui en C-terminal apparaît comme très minoritaire. Cette étude a permis de désigner les acides aminés critiques ciblés par les protéases et va permettre la conception d'analogues de la Pyr¹-apéline-13 aux stabilités améliorées.

MANUSCRIT DE L'ARTICLE 2

Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid

Alexandre Murza,^{1,3} Karine Belleville,^{2,3} Jean-Michel Longpré,^{2,3} Philippe Sarret,^{2,3} Éric Marsault^{1,3*}

¹*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

²*Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

³*Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

* Corresponding author:

Éric Marsault, Ph.D.

Université de Sherbrooke

Faculty of medicine and health sciences

Pharmacology department

3001, 12^{ème} Avenue Nord

Sherbrooke QC, J1H5N4

CANADA

Email: eric.marsault@usherbrooke.ca

KEYWORDS

Apelin analogs, unnatural amino acids, plasma stability, proteolytic cleavage, *in vivo* degradation

Abstract

Apelin is the endogenous ligand of APJ, which belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors. In recent years, the apelin/APJ system has been detected in many tissues and emerges as a promising target for the treatment of various pathophysiological conditions. Pyr1-apelin-13 is the major isoform of apelin in human plasma, however its stability and proteolytic degradation pattern remain poorly understood. The aim of the present study was first to identify the cleavage sites of Pyr1-apelin-13 in mouse, rat and human plasma and rat cerebrospinal fluid, then to determine its stability to proteolytic degradation following intravenous administration in rats. Secondly, key residues were substituted by natural and unnatural amino acids in order to examine the impact on *in vitro* stability and degradation pattern. The kinetics of degradation revealed that the Leu5-Ser6 peptide bond of Pyr1-apelin-13 is the first cleavage observed in plasma, independently of the species. Replacement of Phe13 by unnatural amino acids showed a 10-fold increase in plasma stability although the hydrolysis of Pro12-Phe13 bond, previously described as a site of cleavage by ACE-2, was not observed. *In vivo*, this Pro12-Phe13 bond was cleaved yet appears as a minor product compared to hydrolysis of the Pro10-Met11 bond. This study pinpoints the most critical amino acids targeted by proteases and will be instrumental for the design of Pyr1-apelin-13 analogs possessing increased stability.

Introduction

The apelin receptor (APJ) was first cloned in 1993¹ and belongs to class A G protein-coupled receptor (GPCR) family. Its endogenous ligand, apelin, was discovered five years later.² Apelin is cleaved from the N-terminus of the 77-residue precursor pre-pro-apelin and circulates *in vivo* as several isoforms, namely apelin-36, -17 and -13 (or its pyroglutamate analog Pyr1-apelin-13, **Figure 1**).³

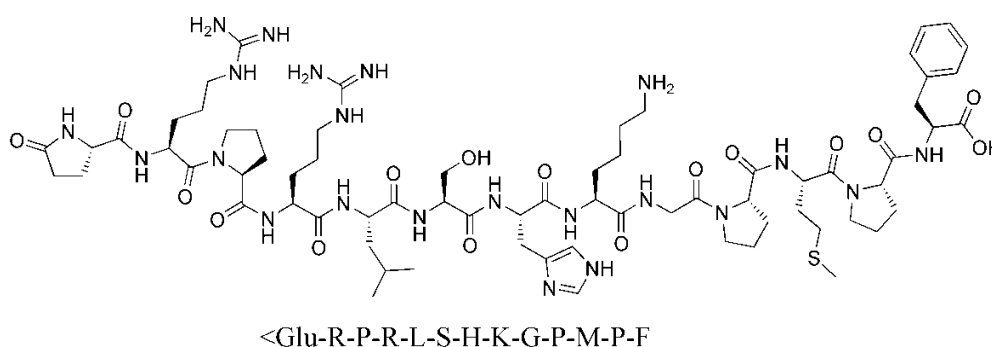


FIGURE 1 Structure of the pyroglutamate analog of apelin-13: Pyr1-apelin-13.

The apelinergic system is widely distributed in peripheral tissues, particularly in the heart, lung, kidney and pancreas.⁴⁻⁶ In the central nervous system, the apelin/APJ complex is mainly expressed in hypothalamic structures, notably in supraoptic and paraventricular nuclei.^{4,7,8} In recent years, the role of the apelinergic system has been highlighted in a wide range of physiological functions and pathological conditions, including fluid homeostasis, angiogenesis, modulation of the cardiovascular system, diabetes and HIV infection.⁹⁻¹³ As a regulatory peptide of the cardiovascular system, apelin has notably been shown to exert hypotensive and inotropic positive effects *in vivo* and *in vitro*.¹⁴⁻¹⁷ In terms of homology among species, the mouse APJ possesses 91% sequence homology with the human receptor, whereas rat and human receptors possess 89% homology.³

At the cellular level, activation of APJ triggers intracellular signaling pathways through $G_{i/o}$ - and G_q -mediated coupling.^{6,18} Interestingly, the different apelin isoforms recruit both β -arrestin1 and β -arrestin2 but induce APJ internalization through different intracellular trafficking routes. Indeed, internalized receptors are rapidly recycled to the cell surface following Pyr1-apelin-13, whereas apelin-36 stimulation results in an intracellular sequestration of APJ.¹⁹ The apelin receptor shares 40-50% identity with the angiotensin

AT1 receptor in the transmembrane regions, although angiotensin II does not bind to APJ.^{1,2} Additionally, angiotensin II and apelin share the same two C-terminal amino acids, and the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) was reported to hydrolyze Pyr1-apelin-13 between residues Pro12 and Phe13.²⁰ Recently, Zhen *et al.* demonstrated that Pyr1-apelin-13 is the major isoform circulating in human plasma at concentrations ranging from 7.7 to 23.3 pg/ml.²¹ Moreover, Pyr1-apelin-13 was found to be more potent than apelin-17 and apelin-36 in lowering blood pressure and in the extracellular acidification rate-promoting activity of CHO cells expressing the apelin receptor.^{5,22}

Development of modified Pyr1-apelin-13 analogs is the subject of a growing body of literature. In particular, the C-terminal Phe13 amino acid represents an attractive target for modulation of the pharmacological activity of the hormone. Indeed, it has been demonstrated that Phe13 is critical for the hypotensive action of Pyr1-apelin-13 *in vivo*,²³ for *in vivo* stability against ACE-2 proteolytic cleavage²⁰ and for APJ internalization.²⁴ We recently synthesized new analogs modified at selected positions with unnatural amino acids to better define the structure-activity relationships of the apelin peptide.²⁵ Moreover, macrocyclic APJ agonists and antagonists were also designed and represent interesting pharmacological tools due to their potential improved stability.²⁶⁻²⁹ Finally, new analogs modified on residues Pro12 and Phe13 were found to be more resistant to direct ACE-2 cleavage, this improved stability pattern being associated with a greater protective effect against *ex vivo* and *in vivo* myocardial ischemia-reperfusion injury.³⁰

To date, the degradation pattern of Pyr1-apelin-13 in plasma remains poorly understood. Pinpointing cleavage sites and modifying more sensitive residues could open the way toward analogs with improved stability, providing useful tools for the study of the apelin/APJ system in various physiological conditions. In the present study, our goal was to identify the cleavage sites of Pyr1-apelin-13 following incubation in mouse, rat and human plasma and rat cerebrospinal fluid (CSF) as a first step, then to assess the degradation pattern after intravenous administration in rats. Finally, we synthesized analogs of Pyr1-apelin-13 modified at selected positions with natural and unnatural amino acids to link structural modifications, impact on plasma stability and degradation profiles.

Results and Discussion

Stability and plasma degradation of Pyr1-apelin-13 and analogs modified at positions 5 and 6

Pyr1-apelin-13 was incubated in rat, mouse and human plasma as well as in rat cerebrospinal fluid for 30 min, 1 h and 2 h at 37°C. In those conditions, we observed a first cleavage of Pyr1-apelin-13 (Mw 1533.8 Da) between Leu5 and Ser6 leading to the generation of N-terminal (Mw 651.7 Da) and C-terminal fragments (Mw 900.1 Da). The C-terminal sequence, namely Ser6→Phe13 underwent a second cleavage, characterized by a deletion of Ser6 residue (Mw 812.9 Da) as illustrated in **Figure 2**.

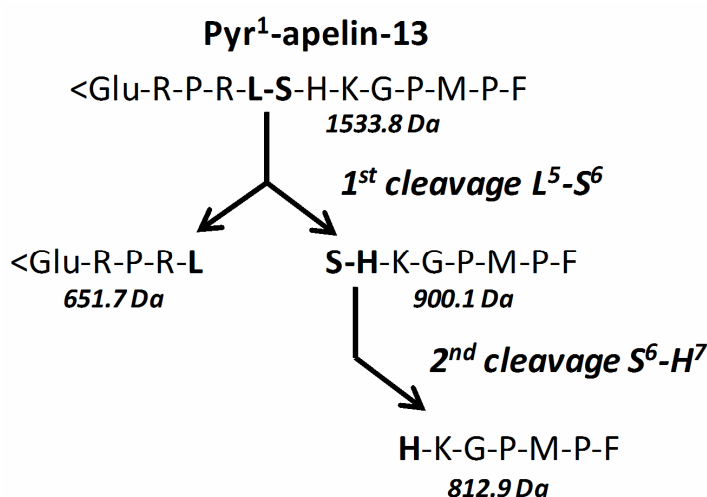


FIGURE 2. Pyr1-apelin-13 degradation pattern in rat, mouse or human plasma and in rat cerebrospinal fluid. Pyr1-apelin-13 was incubated in plasma during 30 min, 1 h and 2 h at 37°C and then analyzed by HPLC-MS at $\lambda=223$ nm to determine the molecular weights of the cleaved fragments.

To be noted that there is no spontaneous degradation of Pyr1-apelin-13, these cleavage are the result of proteases in the plasma. The degradation pattern of Pyr1-apelin-13 in plasma was identical in the three species. In rat CSF, the mass signal intensity corresponding to peptides Leu5→Phe13 and Ser6→Phe13 appeared to be significantly lower than those observed in plasma (subsequently confirmed in **Figure 3A**). Interestingly, the first cleavage Leu5-Ser6 occurred in the most structured region of Pyr1-apelin-13 containing the Arg2-Pro3-Arg4-Leu5-Ser6 moiety.³¹ Moreover, Macaluso *et al.* suggested that the Ser6 side chain would make a hydrogen bond with the carbonyl backbone of Leu5

contributing to a type I β -turn for Arg4-Leu5-Ser6-His7 moiety.²⁸ This turn could probably play an important role for the protease recognition of the cleavage site.

Surprisingly, we did not notice any cleavage between Pro12 and Phe13, although this site of cleavage was observed *in vivo*.²⁰ This may be rationalized by the fact that during the plasma processing, ACE-2 activity might be lost. In order to support this result, we synthesized Leu5 and Ser6 analogs modified with natural and unnatural amino acids and assessed their stability in rat plasma after 30 min, 1 h, 2 h and 3 h incubation at 37°C (Table 1, Suppl. Info. S1).

Analog	Sequence ^a	Rat plasma half-life $t_{1/2}$ (min) ^b
Pyr ¹ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	14.1 ± 2.1
Pyr ¹ -Nle ¹¹ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F	15.7 ± 2.0
Pyr ¹ -Phe ⁵ -apelin-13	<Glu-R-P-R-F-S-H-K-G-P-Nle-P-F	16.6 ± 1.3
Pyr ¹ -Cha ⁵ -apelin-13	<Glu-R-P-R- Cha -S-H-K-G-P-Nle-P-F	22.3 ± 2.2
Pyr ¹ -Lys ⁵ -apelin-13	<Glu-R-P-R- K -S-H-K-G-P-Nle-P-F	9.1 ± 2.5
Pyr ¹ -Glu ⁵ -apelin-13	<Glu-R-P-R- E -S-H-K-G-P-Nle-P-F	35 ± 8
Pyr ¹ -(D)Leu ⁵ -apelin-13	<Glu-R-P-R-(D)L-S-H-K-G-P-M-P-F	52 ± 9
Pyr ¹ -(D)Ser ⁶ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-(D)S-H-K-G-P-M-P-F	45 ± 10
Pyr ¹ -Tyr(OBn) ¹³ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	66 ± 9
Pyr ¹ -(L- α -Me)Phe ¹³ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(L- α -Me)F	> 120
Pyr ¹ -Bpa ¹³ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bpa	55 ± 7
Pyr ¹ -(4-Me)Phe ¹³ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phe(4-Me)	43 ± 6
Pyr ¹ -(D)Phe ¹³ -apelin-13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-(D)F	13.0 ± 1.9

^a Structure of unnatural amino acids can be found in supplemental data S2.

^b Values represent the mean ± SD of three determinations after 30 min, 1 h, 2 h and 3 h incubation in rat plasma, and were calculated by taking the ratio between surface areas of internal standard (Fmoc-Gly) and compound signals by HPLC/UV at λ = 223 nm.

TABLE 1. Structure and rat plasma half-life of apelin-13 analogs modified at positions Leu5, Met11 and Phe13.

Some of these analogs possessed the Met11Nle substitution to circumvent oxidation byproducts frequently associated with the presence of Met in peptides.³² However, the Met11Nle analog exhibited plasma stability and degradation profiles identical to that of the parent peptide, indicating that this modification had no significant impact for our study (Figure 2 & 3A). While Pyr1-apelin-13 had a half-life ($t_{1/2}$) of 14.1 ± 2.1 min *in vitro*, Leu5 substitutions by Phe, cyclohexylalanine (Cha), Lys and Glu respectively led to $t_{1/2}$ of 16.6 ± 1.3 min; 22.3 ± 2.2 min; 9.1 ± 2.5 min and 35 ± 8 min following incubation with rat plasma (Figure 3A, Table 1). The introduction of a positive charge or an aromatic moiety in place of the Leu aliphatic side chain did not seem to significantly improve plasma stability, while

a negative charge (Leu5Glu) increased plasma stability. Successive replacements of Leu5 and Ser6 for their D-isomers also improved significantly *in vitro* half-life (52 ± 9 min and 45 ± 10 min, respectively), compared to Pyr1-apelin-13 (**Figure 3A, Table 1**). Subsequently, we assessed the impact of D-Leu5 substitution on the degradation profile of apelin. As represented in **Figure 3B**, the D-Leu5 modification abrogated Leu5-Ser6 hydrolysis since the first cleavage of D-Leu5Leu analog occurred between His7 and Lys8 followed by deletion of His7.

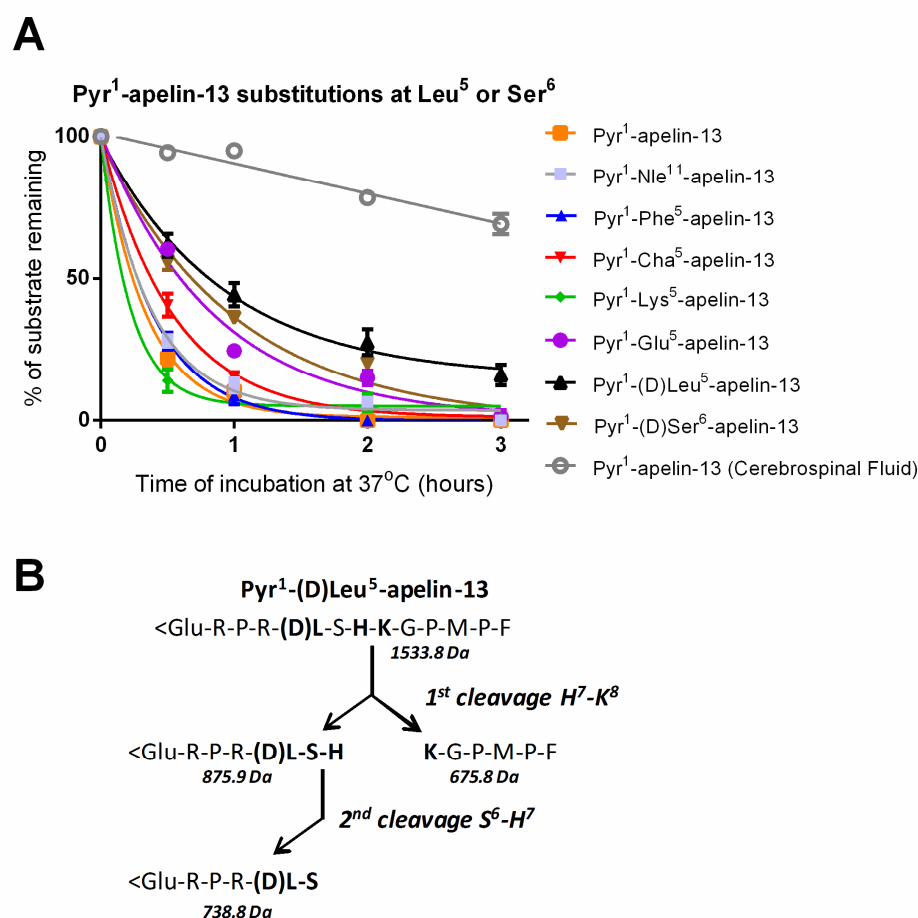


FIGURE 3. Rat plasma stability curves of Pyr1-apelin-13 analogs modified at positions Leu5 or Ser6 and degradation pattern of Pyr1-(D)Leu5-apelin-13. **A.** Rat plasma stability curves of Pyr1-apelin-13 analogs modified at positions Leu5 and Ser6. Pyr1-apelin-13 analogs were incubated in rat plasma during 30 min, 1 h, 2 h and 3 h at 37°C and the percentage of remaining analog was calculated by doing the ratio between the area under the curve (AUC) of analog and AUC of internal standard (Fmoc-Glycine). **B.** Degradation pattern of Pyr1-(D)Leu5-apelin-13 in rat plasma. Pyr1-(D)Leu5-apelin-13 was incubated in rat plasma during 30 min, 1 h and 2 h at 37°C and then analyzed by HPLC-MS at $\lambda=223$ nm to determine the molecular weights of the cleaved fragments.

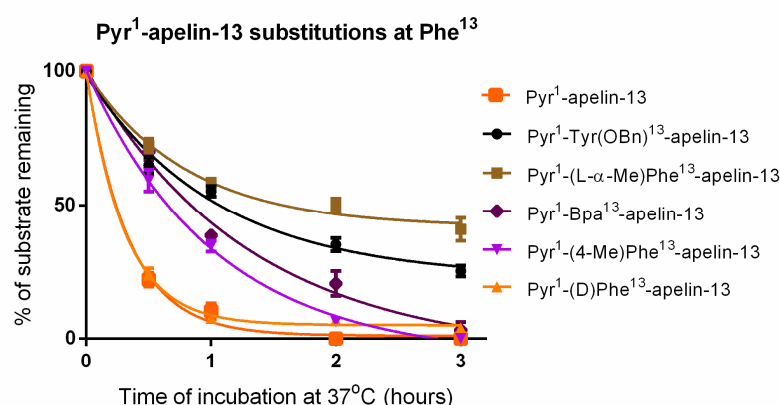
Stability and plasma degradation of Pyr1-apelin-13 analogs modified at position 13

We previously reported that modification of the C-terminal Phe13 residue markedly modified affinity for APJ and affected coupling to second messengers.²⁵ In order to better assess the impact of such modifications on plasma stability, we synthesized new C-terminal substituted analogs of Pyr1-apelin-13 modified at position 13 (**Table 1, Suppl. Info. S1**). As represented in **Figure 4A**, Tyr(OBn), Bpa and (4-Me)Phe replacements significantly-increased peptides half-life (66 ± 9 min; 55 ± 7 min; 43 ± 6 min, respectively), compared to Pyr1-apelin-13 ($t_{1/2} = 14.1 \pm 2.1$ min). Impressively, replacement of the Phe13 residue by its (L- α -Me)Phe analog resulted in a higher plasma half-life ($t_{1/2} > 120$ min) (**Suppl. Info. S2**). Interestingly, the half-life of analog D-Phe13 was very similar to that of Pyr1-apelin-13. We further assessed the impact of the (L- α -Me)Phe13 modification on the degradation pattern via incubation *in vitro* in rat plasma during 30 min, 1 h and 2 h of incubation at 37°C. The degradation pattern was identical to that of Pyr1-apelin-13 (**Figure 4B**), suggesting that C-terminal modification did not prevent the hydrolysis of the Leu5-Ser6 peptide bond in plasma, unlike D-Leu5 mutation. Yet, this modification markedly delayed proteolytic degradation. The fact that Phe13 modifications have a greater impact on plasma stability compared to Leu5 replacement could be surprising judging by the degradation pattern of Pyr1-apelin-13. This suggests that the proteolytic cleavage by the enzyme responsible for the Leu5-Ser6 cleavage may be more affected by structural modifications on P₈' than on P₁ or P₁'. Such influence of a distant site on proteolytic processing is not unprecedented. Indeed for example, the endothelin-converting enzyme (ECE) cleaves the big ET-1(19-34) between Trp21 and Val22. Peptides substituted by alanine at these positions are still more susceptible than big ET-1 to the ECE. However, the substitution [Ala33]big ET-1(19-34) greatly reduced the ECE proteolytic activity, suggesting that P₁₂' is more critical for ECE activity than P₁ or P₁' amino acids.³³

In order to further elucidate which class of protease is involved in the cleavage of the Leu5-Ser6 peptide bond, we incubated Pyr1-apelin-13 in rat plasma in the presence of two metalloprotease inhibitors (EDTA or 1-10-*o*-phenanthroline³⁴), or a broad spectrum serine protease inhibitor (phenylmethylsulfonyl fluoride³⁵) (**See Suppl. Info. S3**). Our results indicate that the mass signal corresponding to the Leu5-Ser6 cleavage was still present in the presence of phenylmethylsulfonyl fluoride and totally absent following

incubation for 15 and 30 min with EDTA or 1-10-*o*-phenanthroline. These data suggest that the Leu5-Ser6 proteolysis is the result of proteolysis by a zinc metalloprotease. Indeed, 1-10-*o*-phenanthroline is known to target mainly zinc metalloproteases.³⁶ Additional studies are underway to further elucidate which protease is responsible for this cleavage and will be reported in due course.

A



B

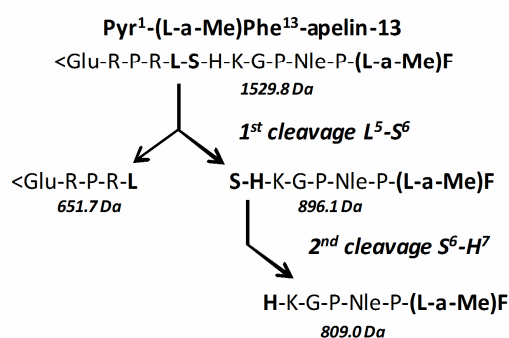


FIGURE 4. Rat plasma stability curve of Pyr1-apelin-13 analogs modified at Phe13 position and degradation pattern of Pyr1-(L-α-Me)Phe13-apelin-13. **A.** Rat plasma stability curves of Pyr1-apelin-13 analogs modified in position Phe13. Pyr1-apelin-13 analogs were incubated in rat plasma for up to 3 h at 37°C. The percentage of remaining analog was calculated by doing the ratio between AUC of analog and AUC of internal standard (Fmoc-Glycine). **B.** Degradation pattern of Pyr1-(L-α-Me)Phe13-apelin-13 in rat plasma. Pyr1-(L-α-Me)Phe13-apelin-13 was incubated in rat plasma during 30 min, 1 h and 2 h at 37°C and then analyzed by HPLC-MS at $\lambda=223$ nm to determine the molecular weights of the cleaved fragments.

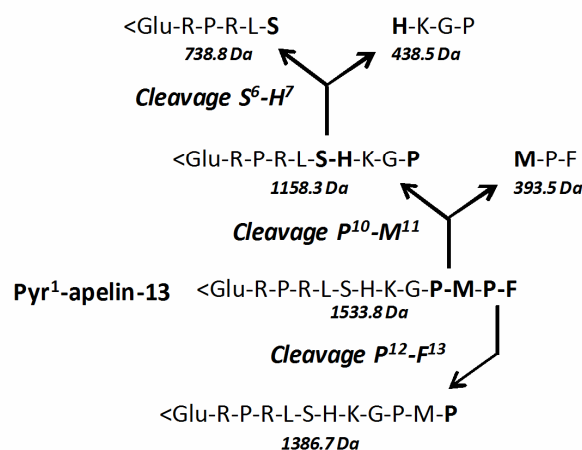
In vivo stability of Pyr1-apelin-13 and modified (L- α -Me)Phe13 analog

The degradation pattern of a peptide in isolated plasma assay or *in vivo* may differ owing to the difference between the two environments. Indeed, when injected intravenously (i.v.), the peptide is transported via the systemic circulation and passes through multiple tissues where numerous different types of proteases, not necessarily found in plasma, may be expressed. Thus, in order to further understand the proteolysis of Pyr1-apelin-13 and to what extent a modification at the C-terminal amino acid would modify the degradation pattern of the entire peptide, Pyr1-apelin-13, Met11Nle analog and Pyr1-(L- α -Me)Phe13-apelin-13 were injected i.v. to adult male Sprague Dawley rats. Compounds were injected into the caudal vein at 10 mg/kg per rat. Blood samples were taken from the same vein before (pre-dose, t=0) and after peptide administration at different time points (1, 3, 5 and 10 min).

For Pyr1-apelin-13 after 1 min, the predominant mass signal corresponded to the parent peptide. As opposed to the above *in vitro* plasma stability study, the product of Pro12-Phe13 cleavage operated by ACE-2²⁰ was observed *in vivo*, albeit in minor proportions. Pyr1-apelin-13 was also hydrolyzed between Pro10 and Met11 followed by a cleavage between Ser6-His7, as testified by mass signals of His7→Pro10 and Pyr1→Ser6 moieties (Mw 438.5 and 738.8 Da, respectively). We did not observe any signal corresponding to Pyr1→Leu5 or Ser6→Phe13 fragments. Therefore we cannot conclude whether the Leu5-Ser6 cleavage observed *in vitro* also occurred *in vivo*. After 3 min, the same fragments were observed with an important decrease for Pyr1-apelin-13 and Pyr1→Pro12 intensity signals. Finally, at times 5 and 10 min after injection, the signals for the above peptides were not found, an observation possibly attributed to renal excretion. The *in vivo* half-life of Pyr1-apelin-13 appeared to be very short (< 5 min). A summary of the observed degradation pattern is illustrated in **(Figure 5A)**. Analog Met11Nle exhibited exactly the same profile compared to the parent peptide. The cleavage of the Pro10-Met11 bond observed on Pyr1-apelin-13 was also observed between Pro10 and Nle11 indicating that this modification does not impact *in vivo* degradation. The degradation profile of Pyr1-(L- α -Me)Phe13-apelin-13 analog led to the same *in vivo* degradation pattern, except for cleavage between Pro12 and Phe13, which was not observed **(Figure 5B)**. Thus, it seems that replacement of residue Phe13 by (L- α -Me)Phe prevents ACE-2 cleavage, yet does not

affect overall *in vivo* half-life. Similarly to Pyr1-apelin-13, the mass signal corresponding to the intact Pyr1-(L- α -Me)Phe13-apelin-13 peptide completely disappeared 5 min after i.v. injection. This observation, which *a priori* contrasts with the important *in vitro* plasma half-life (>120 min), may be attributed to rapid renal excretion, although this remains to be investigated.

A



B

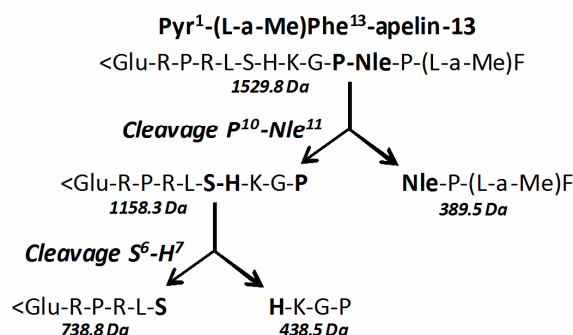


FIGURE 5. Degradation patterns of Pyr1-apelin-13 and (L- α -Me)Phe13 analog *in vivo* in male rats. Degradation pattern of Pyr1-apelin-13 (**A**) and of Pyr1-(L- α -Me)Phe13-apelin-13 (**B**) *in vivo* in male rats. Both compounds were administered i.v. at 10 mg/kg per rat. Blood samples were collected at different time points following administration. Plasma samples were analyzed by HPLC-MS at $\lambda=223$ nm to determine the molecular weights of the cleaved fragments.

Conclusion

In this study, we analyzed the plasma degradation pattern of Pyr1-apelin-13 *in vitro* in mouse, rat and human plasma as well as in rat CSF. In plasma from each species and CSF, Pyr1-apelin-13 was first cleaved between Leu5 and Ser6, followed by Ser6 deletion. In addition, half-life in rat plasma was short (14.1 min in this assay). To decipher the importance of Leu5, Ser6 and Phe13 position on Pyr1-apelin-13 stability, we synthesized modified Pyr1-apelin-13 analogs at these three positions and assessed their stability in rat plasma. Surprisingly, substitution of Leu5 and Ser6 amino acids appeared to have a minor effect on plasma stability compared to Phe13 modifications, which otherwise did not affect the degradation pattern compared to the parent peptide. The degradation patterns of Pyr1-apelin-13, Met11Nle analog and of its C-terminal analog possessing improved *in vitro* plasma stability were also assessed *in vivo*. As opposed to the *in vitro* study, Pyr1-apelin-13 was cleaved at the Pro12-Phe13 and Pro10-Met11 linkages. However, the C-terminal substitution of Pyr1-apelin-13 appeared to prevent Pro12-Phe13 hydrolysis without affecting other cleavages.

To our knowledge, this is the first study of the degradation pattern of Pyr1-apelin-13 in plasma from several species. Moreover, a preliminary structure-activity relationship study at the proteolytically sensible positions of Pyr1-apelin-13 emerges and is under investigation. The discovery of the most critical amino acids targeted by proteases will allow the design of more stable Pyr1-apelin-13 analogs that will become potent pharmacological tools to better understand physiological roles and pathological implications of apelin.

Acknowledgments

Financial support from The Université de Sherbrooke, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Collaborative Research & Development Grant with Tranzyme Pharma) and the FRQS-funded Réseau Québécois de Recherche sur le Médicament (RQRM). The Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS) and the FRQNT-funded Proteo network are also acknowledged for a scholarship and a travel scholarship to A.M, respectively. PS is recipient of the Canada Research Chair in Neurophysiopharmacology of Chronic Pain.

Materials and methods

Materials

Protected amino acids and TentaGel S PHB, O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl] polyethylene glycol resin were purchased from ChemImpex International (USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Canada), Fisher Scientific (USA) or ACP (Canada) and were of the highest commercially available purity. Peptide synthesis was performed in 12 mL polypropylene cartridge with 20 μ m PE frit from Applied Separations (USA).

Peptide synthesis

Pyr1-apelin-13 analogs were synthesized on solid phase using the Fmoc strategy as previously described.²⁵ Crude peptides were purified by reverse-phase chromatography using a preparative HPLC from Waters (Autosampler 2707, Quaternary gradient module 2535, UV detector 2489, fraction collector WFCIII) equipped with an ACE5 C18 column (250 x 21.2 mm, 5 μ m spherical particle size) and water + 0.1% TFA and acetonitrile as eluents. Analytical HPLC chromatograms were recorded on an Agilent 1100 series equipped with UV detector set at 223 nm and an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (3.0 x 50 mm, 2.7 μ m spherical particle size column) using the following method (0→10 min: 2→50% acetonitrile; 10→14 min: 50→100%; 14→18 min: 100%; 18→19 min: 100→2%; 19→24 min: 2%). All analogs possessed UV purity > 97% at 223 nm. Molecular weights of analogs were determined by mass spectrometry (Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters).

Animals and human subjects

Adult male Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke and were in accordance with

policies and directives of the Canadian Council on Animal Care. Blood samples were collected from the caudal vein of conscious animals. 150-200 μ L of blood-free CSF were directly obtained from the cisterna magna of anesthetized rats. Human blood samples were collected from a human volunteer subject. The human research ethics committee took note of the procedure and did not consider that an approval was required.

Stability and degradation patterns in rat, mouse, human plasma and rat cerebrospinal fluid

Plasma from rat, mouse and human was obtained from blood after a centrifugation at 13000 rpm during 5 min at 4°C. Incubation of 27 μ L of rat, mouse, human plasma or rat cerebrospinal fluid and 6 μ L of a 1 mM aqueous solution of analog was done at 37°C for 30 min, 1 h, 2 h and 3 h. Reaction was stopped by adding 70 μ L of acetonitrile. After vortexing and centrifugation at 13000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant was analyzed by HPLC-MS at λ =223 nm (Waters 2695 with ACE C₁₈ column 2.0 x 100 mm, 2.7 μ m spherical particle size, Waters 2487 dual λ absorbance detector and Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters) to determine the molecular weight of the observed fragments. To estimate the half-life of analogs, 30 μ L of the supernatant and 6 μ L of a 1 mM aqueous solution of Fmoc-Glycine (internal standard) was added in each HPLC-UV sample. Analysis were performed on an Agilent 1100 series instrument equipped with UV detector set at λ =223 nm and an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (3.0 x 50 mm, 2.7 μ m spherical particle size column). The percentage of substrate remaining was calculated as the ratio between the AUC (area under the curve) of analog and AUC of Fmoc-Gly in comparison to the same ratio when plasma is replaced by water (buffer). Data were calculated and plotted using GraphPad Prism 6 and represent the mean \pm SD of three experiments.

In vivo degradation

Adult male Sprague Dawley rats (450-650 g, n=4 per peptide) were anesthetized with isoflurane 5% + 2 L/min O₂. Rats were placed on a heating carpet and maintained under isoflurane 2% + 1 L/min O₂ during the experience. Peptides were dissolved in saline 0.9% and injected intravenously in the caudal vein at 10 mg/kg dose per rat. Blood samples

were taken in the same vein (catheter 21G) before (pre-dose) and 1, 3, 5 and 10 min after peptides administration and transferred in K₂EDTA microtubes (BD Diagnostics, Franklin, NJ, USA) directly placed on ice. Between samplings, 200 μ L saline 0.9% was injected in the caudal vein to prevent coagulation. After a centrifugation at 13000 rpm at 4°C during 5 min, plasma phases were recovered and kept at -20°C. Plasma samples were analyzed by HPLC-MS at λ =223 nm (Waters 2695 with ACE C₁₈ column 2.0 x 100 mm, 2.7 μ m spherical particle size, Waters 2487 dual λ absorbance detector and Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters) to determine the molecular weights of cleaved fragments.

References

1. O'Dowd, B. F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H. H.; Tsui, L. C.; Kennedy, J. L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S. R.; Nguyen, T. *Gene* 1993, 136, 355-360.
2. Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M. X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Fujino, M. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 251, 471-476.
3. Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Bonner, T. I.; Davenport, A. P. *Pharmacol Rev* 2010, 62, 331-342.
4. O'Carroll, A. M.; Selby, T. L.; Palkovits, M.; Lolait, S. J. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1492, 72-80.
5. Hosoya, M.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Fujii, R.; Habata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Honda, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Nishimura, O.; Fujino, M. *J Biol Chem* 2000, 275, 21061-21067.
6. Medhurst, A. D.; Jennings, C. A.; Robbins, M. J.; Davis, R. P.; Ellis, C.; Winborn, K. Y.; Lawrie, K. W.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J. E.; Herrity, N. C.; Murdock, P.; Darker, J. G. *J Neurochem* 2003, 84, 1162-1172.
7. Lee, D. K.; Cheng, R.; Nguyen, T.; Fan, T.; Kariyawasam, A. P.; Liu, Y.; Osmond, D. H.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. *J Neurochem* 2000, 74, 34-41.
8. Reaux, A.; De Mota, N.; Skultetyova, I.; Lenkei, Z.; El Messari, S.; Gallatz, K.; Corvol, P.; Palkovits, M.; Llorens-Cortes, C. *J Neurochem* 2001, 77, 1085-1096.
9. Wang, G.; Anini, Y.; Wei, W.; Qi, X.; AM, O. C.; Mochizuki, T.; Wang, H. Q.; Hellmich, M. R.; Englander, E. W.; Greeley, G. H., Jr. *Endocrinology* 2004, 145, 1342-1348.
10. Wang, G.; Kundu, R.; Han, S.; Qi, X.; Englander, E. W.; Quertermous, T.; Greeley, G. H., Jr. *Regul Pept* 2009, 158, 32-39.
11. Boucher, J.; Masri, B.; Daviaud, D.; Gesta, S.; Guigne, C.; Mazzucotelli, A.; Castan-Laurell, I.; Tack, I.; Knibiehler, B.; Carpenne, C.; Audigier, Y.; Saulnier-Blache, J. S.; Valet, P. *Endocrinology* 2005, 146, 1764-1771.
12. Kasai, A.; Shintani, N.; Oda, M.; Kakuda, M.; Hashimoto, H.; Matsuda, T.; Hinuma, S.; Baba, A. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 325, 395-400.

13. Fan, X.; Zhou, N.; Zhang, X.; Mukhtar, M.; Lu, Z.; Fang, J.; DuBois, G. C.; Pomerantz, R. J. *Biochemistry* 2003, 42, 10163-10168.
14. Scimia, M. C.; Hurtado, C.; Ray, S.; Metzler, S.; Wei, K.; Wang, J.; Woods, C. E.; Purcell, N. H.; Catalucci, D.; Akasaka, T.; Bueno, O. F.; Vlasuk, G. P.; Kaliman, P.; Bodmer, R.; Smith, L. H.; Ashley, E.; Mercola, M.; Brown, J. H.; Ruiz-Lozano, P. *Nature* 2012, 488, 394-398.
15. Berry, M. F.; Pirolli, T. J.; Jayasankar, V.; Burdick, J.; Morine, K. J.; Gardner, T. J.; Woo, Y. J. *Circulation* 2004, 110, II187-193.
16. Szokodi, I.; Tavi, P.; Foldes, G.; Voutilainen-Myllyla, S.; Ilves, M.; Tokola, H.; Pikkarainen, S.; Piuholo, J.; Rysa, J.; Toth, M.; Ruskoaho, H. *Circ Res* 2002, 91, 434-440.
17. Chamberland, C.; Barajas-Martinez, H.; Haufe, V.; Fecteau, M. H.; Delabre, J. F.; Burashnikov, A.; Antzelevitch, C.; Lesur, O.; Chraïbi, A.; Sarret, P.; Dumaine, R. *J Mol Cell Cardiol* 2009, 48, 694-701.
18. Yue, P.; Jin, H.; Xu, S.; Aillaud, M.; Deng, A. C.; Azuma, J.; Kundu, R. K.; Reaven, G. M.; Quertermous, T.; Tsao, P. S. *Endocrinology* 2011, 152, 59-68.
19. Lee, D. K.; Ferguson, S. S.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 395, 185-189.
20. Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; Acton, S.; Patane, M.; Nichols, A.; Tummino, P. *J Biol Chem* 2002, 277, 14838-14843.
21. Zhen, E. Y.; Higgs, R. E.; Gutierrez, J. A. *Anal Biochem* 2013.
22. Tatemoto, K.; Takayama, K.; Zou, M. X.; Kumaki, I.; Zhang, W.; Kumano, K.; Fujimiya, M. *Regul Pept* 2001, 99, 87-92.
23. Lee, D. K.; Saldivia, V. R.; Nguyen, T.; Cheng, R.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. *Endocrinology* 2005, 146, 231-236.
24. Iturrioz, X.; Gerbier, R.; Leroux, V.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C. *J Biol Chem* 2010, 285, 32627-32637.
25. Murza, A.; Parent, A.; Besserer-Offroy, E.; Tremblay, H.; Karadereye, F.; Beaudet, N.; Leduc, R.; Sarret, P.; Marsault, E. *ChemMedChem* 2012, 7, 318-325.
26. Hamada, J.; Kimura, J.; Ishida, J.; Kohda, T.; Morishita, S.; Ichihara, S.; Fukamizu, A. *Int J Mol Med* 2008, 22, 547-552.

27. Macaluso, N. J.; Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Davenport, A. P.; Glen, R. C. *ChemMedChem* 2011, 6, 1017-1023.
28. Macaluso, N. J.; Glen, R. C. *ChemMedChem* 2010, 5, 1247-1253.
29. Golosov, A.; Grosche, P.; Hu, Q.Y.; Imase, H.; Parker, D.T.; Yasoshima, K.; Zecri, F.; Zhao, H. *PCT Int. Appl.* 2013, WO 2013111110 A2.
30. Wang, W.; McKinnie, S. M.; Patel, V. B.; Haddad, G.; Wang, Z.; Zhabyeyev, P.; Das, S. K.; Basu, R.; McLean, B.; Kandalam, V.; Penninger, J. M.; Kassiri, Z.; Vederas, J. C.; Murray, A. G.; Oudit, G. Y. *J Am Heart Assoc* 2013, 2, e000249.
31. Langelaan, D.N.; Bebbington, E.M.; Reddy, T.; Rainey, J.K. *Biochemistry* 2009, 48, 537-548.
32. Vogt, W. *Free Radic Biol Med* 1995, 18, 93-105.
33. Okada, K.; Arai, Y.; Hata, M.; Matsuyama, K.; Yano, M. *Eur J Biochem* 1993, 218, 493-498.
34. Day, T. A.; Chen, G. Z. *Parasitology* 1998, 116 (Pt 4), 319-325.
35. Sekar, V.; Hageman, J. H. *Biochem Biophys Res Commun* 1979, 89, 474-478.
36. Salvesen, G.S.; Nagase, H. *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2001, 2 edn 1: 105-130.

INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES - ARTICLE 2

Stability and degradation patterns of chemically modified analogs of apelin-13 in plasma and cerebrospinal fluid

Alexandre Murza,^{1,3} Karine Belleville,^{2,3} Jean-Michel Longpré,^{2,3} Philippe Sarret,^{2,3} Éric Marsault ^{1,3*}

¹*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

²*Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

³*Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada*

* Corresponding author:

Éric Marsault, Ph.D.

Université de Sherbrooke

Faculty of medicine and health sciences

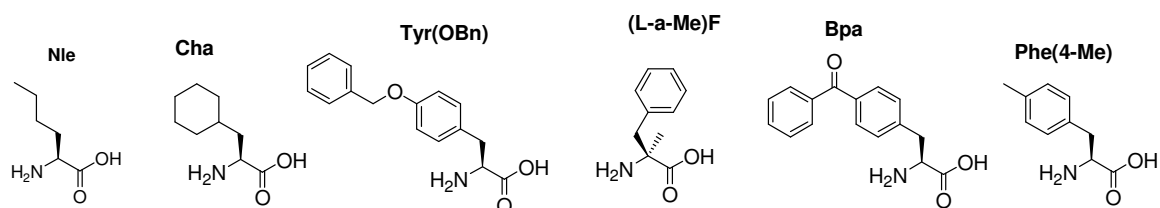
Pharmacology department

3001, 12^{ème} Avenue Nord

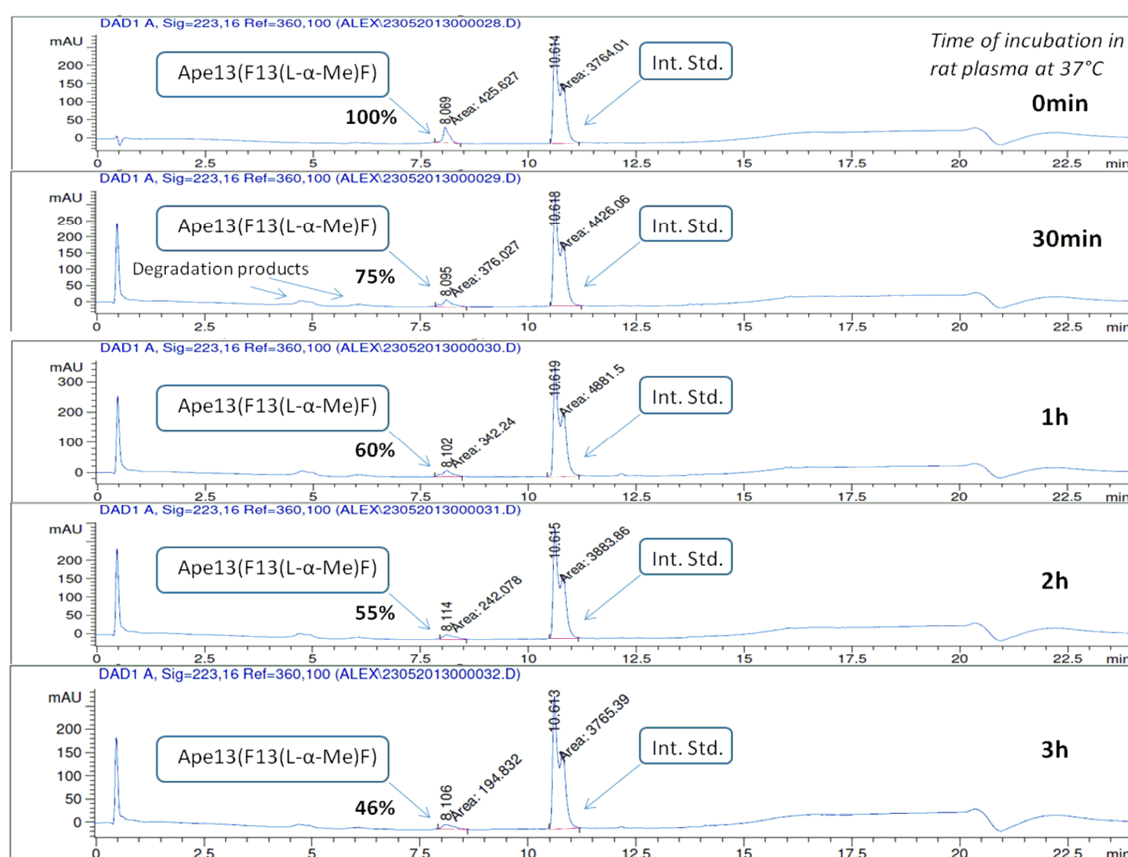
Sherbrooke QC, J1H5N4

CANADA

Email: eric.marsault@usherbrooke.ca



Suppl. Info. S1. Structure of unnatural amino acids.

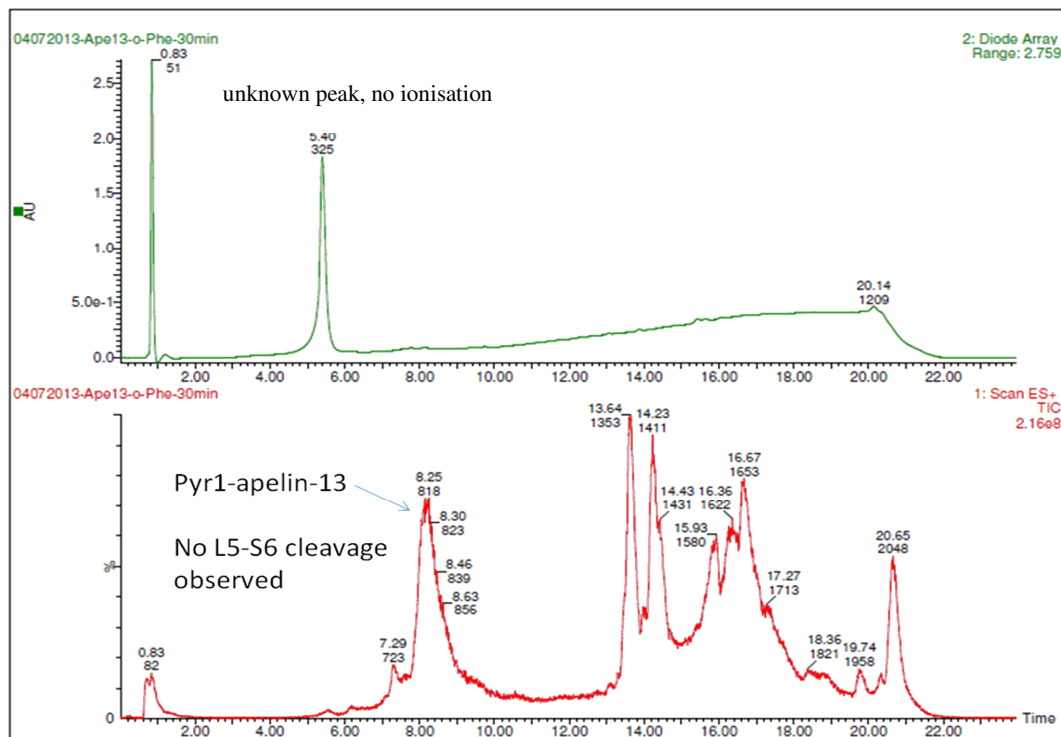


Suppl. Info. S2. HPLC chromatograms showing the percentage Pyr¹-(L- α -Me)Phe¹³-apelin-13 analog after 0 min, 30 min, 1 h, 2 h and 3 h incubation in rat plasma at 37°C calculated by doing the ratio between the area under the curve (AUC) of analog and AUC of Fmoc-Gly (Int. Std.).

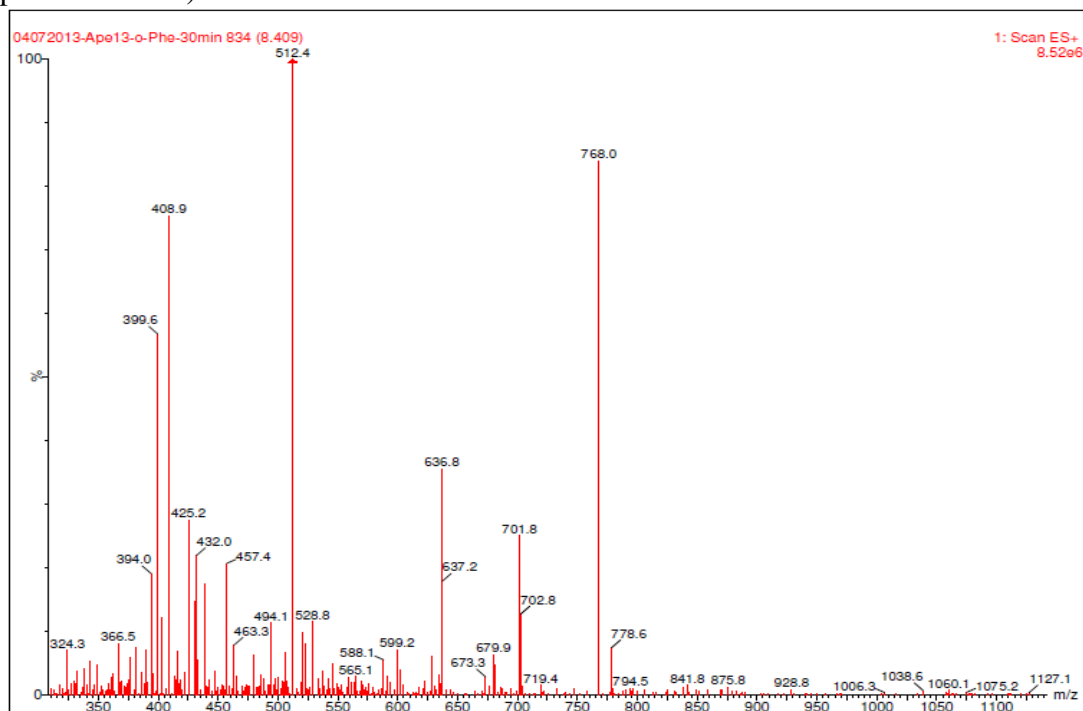
Suppl. Info. S3. Leu⁵-Ser⁶ cleavage studies of Pyr¹-apelin-13 versus metalloprotease or serine protease inhibitors.

Method: 27 μ L of rat plasma and inhibitors (0.27 μ L of a 100 mM solution in methanol of 1-10-*o*-phenanthroline or EDTA (metalloprotease inhibitors; final concentration 1 mM) or 0.54 μ L of a 100 mM solution in ethanol of phenylmethylsulfonyl fluoride (serine protease inhibitor; final concentration 2 mM) were mixed 5 minutes at room temperature. Then, 6 μ L of a 1 mM aqueous solution of Pyr¹-apelin-13 was added and the mixture was incubated at 37°C for 15 and 30 minutes. Reaction was stopped by adding 70 μ L of acetonitrile. After vortexing and centrifugation at 13000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant was analyzed by HPLC-MS at λ =223 nm (Waters 2695 with ACE C₁₈ column 2.0 x 100 mm, 2.7 μ m spherical particle size, Waters 2487 dual λ absorbance detector and Electrospray micromass ZQ-2000 from Waters) to determine the molecular weight of the cleaved fragments.

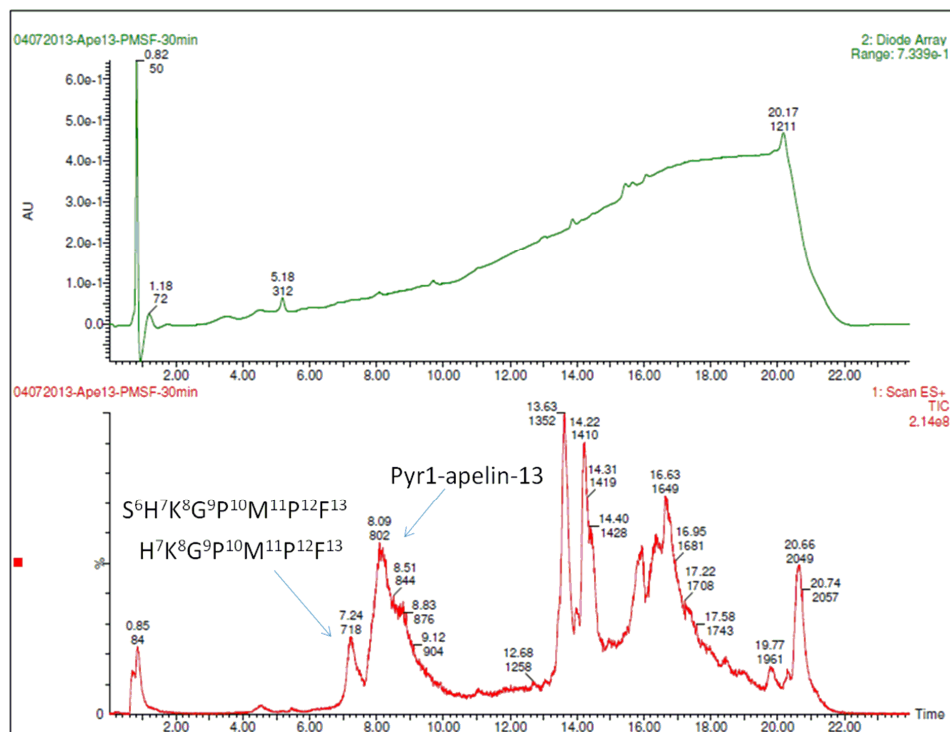
HPLC-MS (TIC vs elution time) of Pyr¹-apelin-13 degradation pattern in rat plasma in presence of 1-10-*o*-phenanthroline after 30 min incubation: No Leu5-Ser6 cleavage observed



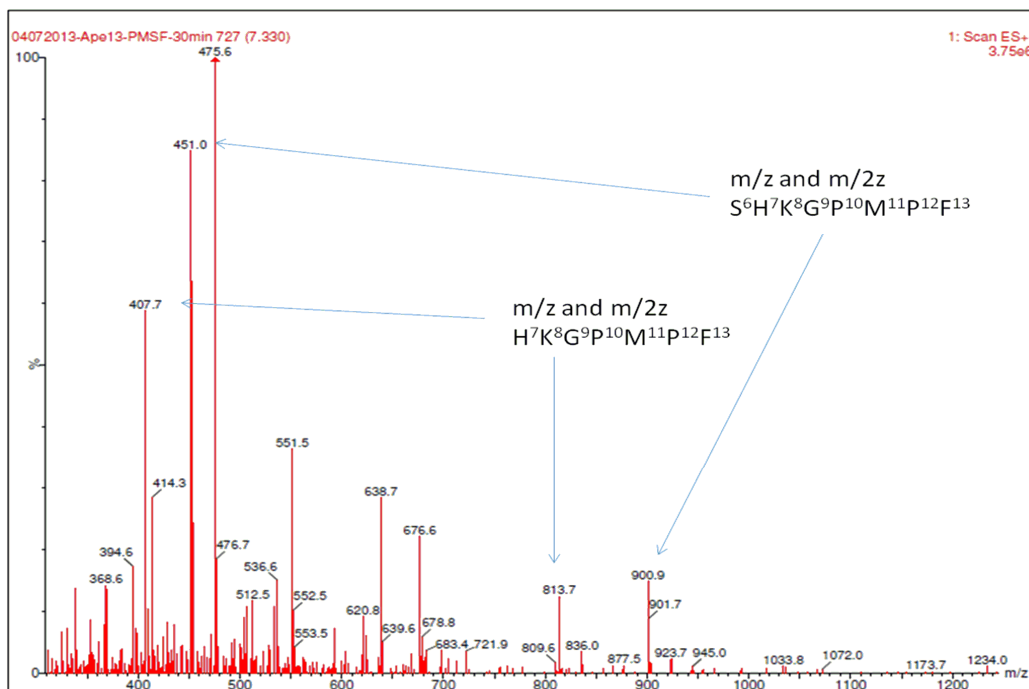
Pyr1-apelin-13 mass signals at $t_R = 8.409$ min (after 30 min incubation with 1-10-*o*-phenanthroline)



HPLC-MS (TIC vs elution time) of Pyr¹-apelin-13 degradation pattern in rat plasma in presence of phenylmethylsulfonyl fluoride after 30 min incubation: Leu5-Ser6 + Ser6-His7 cleavages



Pyr1-apelin-13 mass signals at $t_R = 7.330$ min (after 30 min incubation with phenylmethylsulfonyl fluoride)



ARTICLE 3

C-terminal Modifications of apelin-13 significantly change ligand binding, receptor signaling and hypotensive action

Auteurs de l'article: Alexandre Murza, Élie Besserer-Offroy, Jérôme Côté, Patrick Bérubé, Jean-Michel Longpré, Robert Dumaine, Olivier Lesur, Mannix Auger-Messier, Richard Leduc, Philippe Sarret, Éric Marsault

Statut de l'article: Article accepté dans *Journal of Medicinal Chemistry* (Statut: ASAP)

Avant-propos: J'ai réalisé la synthèse des composés chimiques, les études de radiolisation et de signalisation sur la voie AMPc. Élie Besserer-Offroy a réalisé les essais sur les voies β -arrestines et sur l'activation des protéines G. Jérôme Côté et Patrick Bérubé ont fait les essais *in vivo* sur la pression artérielle. J'ai écrit la première version du manuscrit.

Cet article contribue à répondre aux objectifs 1), 2) et 3).

Note: Les chromatogrammes et les spectres de masse des analogues faisant partie du matériel supplémentaire seront présentés en annexe à la fin de manuscrit.

Résumé: L'apéline est le ligand endogène du récepteur APJ, membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Le système apélinergique joue un rôle important dans différents processus physiologiques, notamment dans la régulation de la pression sanguine et des fonctions cardiovasculaires. Il a été précédemment démontré que l'acide aminé C-terminal de l'apéline-13, le résidu Phe¹³, est crucial pour les effets hypotenseurs induits par l'apéline. Afin de mieux comprendre le rôle de ce résidu et son impact sur la liaison, la signalisation et les effets hypotenseurs du système apélinergique, nous avons synthétisé une série d'analogues de l'apéline-13, dont le résidu Phe¹³ a été substituée par une variété d'acides aminés naturels et non-naturels. Ces modifications ont mené à la découverte de nouveaux composés possédant de très hautes affinités pour le récepteur APJ, et puissances sur la voie de l'inhibition de formation d'AMPc comparé au peptide parent. En effet, les analogues **13** et **17**, pour lesquelles le résidu Phe¹³ a été respectivement remplacé par les résidus Bpa et (L- α -Me)Phe, sont environ 30 fois plus puissant à inhiber la formation d'AMPc suite à une stimulation par la forskoline. L'introduction de l'acide aminé Tyr(OBn) à la place du résidu Phe¹³ (analogue **12**) améliore énormément l'affinité d'un facteur 60 par rapport à l'apéline-13 (IC₅₀ 20 pM vs. IC₅₀ 1.2 nM), faisant de **12** le composé le plus affin pour le récepteur APJ rapporté dans la littérature. Cet analogue a été administré à des rats mâles Sprague-Dawley afin d'évaluer l'impact de la modification chimique sur la pression artérielle. Comparé à l'apéline-13, l'analyse des courbes dose-réponse a révélé que le composé Tyr(OBn) (**12**) induit un effet hypotenseur significativement plus important et plus soutenu. Cette étude propose de nouveaux composés apélinergiques puissants et stables. Ces derniers représentent donc de formidables outils pharmacologiques pour nous aider à mieux comprendre les relations structure-fonction de l'apéline-13.

MANUSCRIT DE L'ARTICLE 3

C-terminal Modifications of apelin-13 significantly change ligand binding, receptor signaling and hypotensive action

Alexandre Murza,^{§,¥} Élie Besserer-Offroy,^{§,¥} Jérôme Côté,^{‡,¥} Patrick Bérubé,^{‡,¥} Jean-Michel Longpré,^{‡,¥} Robert Dumaine,[‡] Olivier Lesur,[#] Mannix Auger-Messier,[#] Richard Leduc,^{§,¥} Philippe Sarret,^{‡,¥,*} Éric Marsault^{§,¥,*}

[§] Département de Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada

[‡] Département de Physiologie et Biophysique, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada

[#] Département de Médecine, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada

[¥] Institut de Pharmacologie de Sherbrooke

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Prof. Éric Marsault

Tel: +1 819.821.8000 ext 12433

Fax: +1 819.564.5400

Email: eric.marsault@usherbrooke.ca

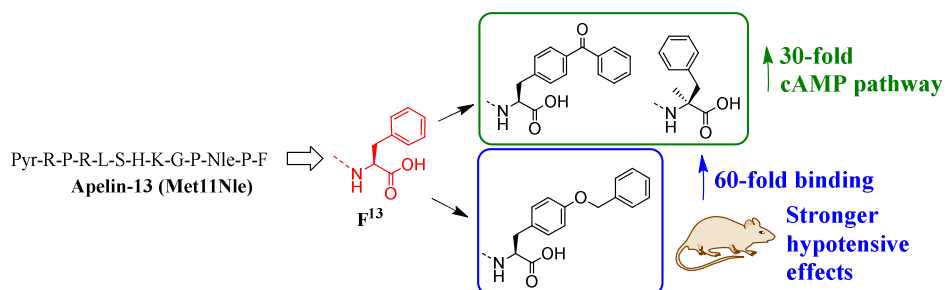
Notes: The authors declare no competing financial interest.

KEYWORDS: apelin, APJ, signaling, hypotension, structure-activity relationships

ABBREVIATIONS USED

GPCR: G protein-coupled receptor, cAMP: Cyclic adenosine monophosphate, CHO: Chinese hamster ovary, HEK: Human embryonic kidney, MAP: Mean arterial pressure, NMR: Nuclear magnetic resonance, ACE2: Angiotensin converting enzyme type 2, ERK1/2: Extracellular regulated kinases 1/2, PPh₃: triphenylphosphine, DIAD: diisopropylazodicarboxylate, DCM: dichloromethane, Ac₂O: Acetic anhydride, DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine, DMF: *N,N*-dimethylformamide, HATU: O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, TFA: Trifluoroacetic acid, TIPS: Triisopropylsilane, TBME: *tert*-butyl methyl ether, HPLC: High performance liquid chromatography, HRMS: High resolution mass spectrometry, FRET: Fluorescence resonance energy transfer, BRET: Bioluminescence resonance energy transfer, ATP: Adenosine triphosphate, AUC: Area under the curve.

TABLE OF CONTENT GRAPHIC



ABSTRACT

Apelin is the endogenous ligand of the APJ receptor, a member of the G protein-coupled superfamily of receptors. The apelinergic system plays important physiological functions, notably in the regulation of blood pressure and cardiovascular functions. It has been previously shown that the C-terminal amino acid Phe¹³ is crucial for the hypotensive effect exerted by apelin-13. To better understand the role of the C-terminal residue and its impact on ligand binding, receptor signaling and hypotensive activity, we synthesized here a series of modified analogs in which the Phe¹³ was substituted by various unnatural amino acids. These modifications led to the identification of new compounds exhibiting higher affinity and potency to inhibit cAMP accumulation, compared to apelin-13. In particular, compounds **13** and **17**, in which the Phe¹³ residue was respectively replaced by Bpa or (L- α -Me)Phe are 30-fold more potent to inhibit the forskolin-stimulated cAMP accumulation. Incorporation of the Tyr(OBn) residue at position 13 (compound **12**) improved its binding affinity for APJ by 60-fold compared to the parent peptide (IC₅₀ 20 pM). Importantly, dose-response curves of the hypotensive effects of analog **12** revealed the substitution of Phe¹³ by Tyr(OBn) induces a sustained and higher drop in blood pressure compared to apelin-13. This study offers new potent and stable pharmacological tools that will help us to better understand the structure-function relationship of apelin-13.

INTRODUCTION

The APJ receptor (hereafter called APJ) is a member of the rhodopsin-like seven transmembrane-domain G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily.¹ APJ shares a high sequence identity with the angiotensin II receptor type 1 (AT1R), however angiotensin-II does not activate APJ. The APJ endogenous ligands apelin-13 and -17 are the predominant forms in rat brain and in rat and human plasma.^{2,3} The apelineric system has been detected in numerous peripheral tissues such as the kidney, heart, pancreas, and lung. In the central nervous system, the apelin/APJ complex is mainly expressed in the hypothalamus and in the spinal cord.⁴⁻⁸ In recent years, apelin has emerged as a potential drug target to treat cardiovascular diseases, obesity and diabetes, as well as gastrointestinal diseases, cancer, and HIV infection.^{9,10} Apelin has most notably been shown to exert hypotensive and positive inotropic effects *in vitro* and *in vivo*.¹¹⁻¹⁴ Indeed, intravenous injection of apelin-17 or -13 in rodents rapidly decreases the mean arterial pressure (MAP) via a nitric oxide (NO) dependent mechanism.^{15,7,16} Additionally, apelin-deficient mice subjected to chronic pressure overload develop severe and progressive heart failure.¹⁷ In humans, the majority of studies show decreased apelin levels in a number of cardiovascular diseases, although methodological differences make it difficult to draw definitive conclusions.¹⁸ Finally, acute intravenous administration of apelin to healthy volunteers and patients with heart failure causes coronary and peripheral vasodilation accompanied by a lowering of blood pressure.^{19,20} These effects were found to be preserved following activation of the renin/angiotensin system in patients with heart failure.²¹ Altogether, these observations strengthen the potential of the apelineric system as an emerging target for the treatment of cardiovascular diseases, as summarized by a number of recent reviews.^{10,18,22}

Owing to these multiple potential applications, a better understanding of the structure-activity and structure-function relationships of apelin has generated an increasing level of interest recently. Of particular interest, substitution of the C-terminal phenylalanine residue of apelin-13 by an alanine or its deletion suppresses its ability to decrease MAP.²³ This should be kept in the context that apelin-13 is hydrolyzed by the angiotensin-converting enzyme type 2 (ACE-2), which cleaves the peptide between residues Pro¹² and Phe¹³.²⁴ Binding of apelin to APJ triggers intracellular signaling pathways through G $\alpha_{i/o}$ - and G α_q -mediated coupling, leading to the activation of downstream effectors, such as ERK1/2, Akt,

protein kinase C and phospholipase C.^{6,25,26–28} Apelin-13 also inhibits forskolin-induced cAMP production, defined as its canonical pathway.^{6,29} Following activation, the APJ receptor can also interact with different β -arrestin isoforms to cause internalization of the receptor. Interestingly, the different isoforms of apelin recruit both β -arrestin1 and β -arrestin2 but appear to induce APJ internalization through different intracellular trafficking routes.³⁰

The structure of apelin was investigated by 2D NMR by Langelan *et al*, who concluded that the Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ fragment adopts a more ordered structure.³¹ The alanine scan performed on apelin-13 (Pyr¹-Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷-Lys⁸-Gly⁹-Pro¹⁰-Met¹¹-Pro¹²-Phe¹³) pinpointed key residues involved in APJ receptor binding and inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation. Replacement of Arg², Arg⁴, and Leu⁵ residues by alanine leads to a robust decrease in binding, cAMP production, and intracellular Ca²⁺ release, consistent with a role as pharmacophores.^{6,32} These conclusions were exploited to design macrocyclic APJ agonists and antagonists.^{33–35} A structure-activity relationship study of the first semi-peptidic APJ agonist E339-3D6³⁶ led to the discovery of more potent and stable agonists for cAMP pathway and APJ internalization compared to E339-3D6.³⁷ The recently published high-resolution NMR structure of the N-terminal and first transmembrane segment of APJ suggests the existence of π - π interactions between residue Phe¹³ of apelin-13 with two aromatic residues of APJ (Phe²⁵⁷ and Trp²⁶¹).³⁸ Additionally to its impact on hypotensive action, the C-terminal Phe residue of apelin-13 has also a central role on APJ internalization and β -arrestin recruitment.^{39,40} While deciphering the degradation pattern of apelin-13 *in vitro* and *in vivo*, our group recently identified that the substitution of residue Phe¹³ by unnatural amino acids significantly improved plasma stability.⁴¹

As detailed above based on recent literature, the C-terminal Phe¹³ residue is critical to fine-tune receptor function.^{42–44} In order to better understand the role of this residue and how it modulates binding and signaling profile as well as *in vivo* effects, we decided to substitute Phe¹³ with unnatural amino acids and studied the impact of this substitution on binding and signaling pathways such as cAMP production, β -arrestins and engagement of G α_{i1} subunit, as well as their impact on blood pressure.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis

Analogues were synthesized by the solid-phase strategy using Fmoc protected amino acids, as previously reported.⁴⁴ Briefly, starting from O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]polyethylene glycol resin or Wang resin, a Mitsunobu reaction in the presence of triphenylphosphine (PPh₃) and diisopropylazodicarboxylate (DIAD) allowed the attachment of the first Fmoc N-protected C-terminal residue. After capping unreacted hydroxyl groups with a mixture of DCM/Ac₂O/DIPEA, Fmoc group was deprotected with 20% piperidine in *N,N*-dimethylformamide (DMF). The following Fmoc N-protected amino acids were then attached stepwise in the presence of [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] (HATU), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF. Final resin cleavage with simultaneous side chains deprotection was performed with a mixture of TFA (trifluoroacetic acid)/H₂O/TIPS (triisopropylsilane). After precipitation in *tert*-butyl methyl ether (TBME), the crude was purified by reverse-phase chromatography, leading to the desired compounds exhibiting purity > 95%, as determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and characterized by High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) (Table 1).

Effects of Phe¹³ modifications on binding affinity

In an effort to better understand the structure-activity relationships of the C-terminal pocket on the APJ receptor and to discover new pharmacological tools, the Phe¹³ moiety was substituted with several natural and unnatural amino acids in continuation of our previous works (Figure 1).⁴⁴ To prevent oxidation side-products generally associated with the presence of Met in peptides,⁴⁵ residue Met¹¹ was replaced by Nle (Table 2). First, replacement of residue Phe¹³ with lipophilic residues Ile, Leu, and Val (**2**, IC₅₀ 11.4 nM; **3**, IC₅₀ 7.9 nM; **4**, IC₅₀ 18.2 nM) provided around 10-fold loss on binding affinity compared to apelin-13 (**1**, IC₅₀ 1.2 nM). This may suggest that these aliphatic side chains are either too short to fully occupy the C-terminal pocket of APJ, or that a π -stacking interaction is replaced by a less favorable hydrophobic interaction. Introduction of electron-donating substituents (resonance or induction) on the aromatic ring with Tyr(OMe) and Phe(4-Me)

residues (**5**, IC₅₀ 0.60 nM; **6**, IC₅₀ 0.25 nM) led to a slight improvement in binding affinity, contrasting with the hypothesis of an electron-rich C-terminal pocket for APJ³⁹ and our previous observations⁴⁴ showing an improved binding affinity for electron-poor aromatic residues in place of Phe¹³.

N°	Sequence	Mol. formula	Purity % [a]	Theoretical mass	Exact mass measured [b]
1	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	C ₆₉ H ₁₀₈ N ₂₂ O ₁₆ S	100.0	1532.8034	1532.8116
2	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-I	C ₆₇ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1480.8627	1480.8723
3	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-L	C ₆₇ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	98.6	1480.8627	1480.8702
4	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-V	C ₆₆ H ₁₁₀ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1466.8470	1466.8857
5	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OMe)	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₇	100.0	1544.8576	1544.8635
6	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phe(4-Me)	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1528.8627	1528.8696
7	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-pyridyl)Ala	C ₆₉ H ₁₀₉ N ₂₃ O ₁₆	100.0	1515.8423	1515.8502
8	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-pyridyl)Ala	C ₆₉ H ₁₀₉ N ₂₃ O ₁₆	100.0	1515.8423	1515.8505
9	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(2-pyridyl)Ala	C ₆₉ H ₁₀₉ N ₂₃ O ₁₆	100.0	1515.8423	1515.8523
10	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phg	C ₆₉ H ₁₀₈ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1500.8314	1500.8391
11	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-hPhe	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1528.8627	1528.8732
12	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	C ₇₇ H ₁₁₆ N ₂₂ O ₁₇	97.1	1620.8889	1620.8967
13	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bpa	C ₇₇ H ₁₁₄ N ₂₂ O ₁₇	100.0	1618.8732	1618.8834
14	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-StyrylAla	C ₇₂ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1540.8627	1540.8690
15	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-dihydroAnthranlylAla	C ₇₈ H ₁₁₆ N ₂₂ O ₁₆	99.6	1616.8940	1616.8950
16	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-benzothienyl)Ala	C ₇₂ H ₁₁₀ N ₂₂ O ₁₆ S	100.0	1570.8191	1570.8294
17	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(L- α -Me)Phe	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	98.9	1528.8627	1528.8729
18	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(D- α -Me)Phe	C ₇₁ H ₁₁₂ N ₂₂ O ₁₆	97.4	1528.8627	1528.8723
19	<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Aminoindane	C ₇₁ H ₁₁₀ N ₂₂ O ₁₆	100.0	1526.8470	1526.8563
20	R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	C ₆₁ H ₉₂ N ₁₆ O ₁₃	100.0	1256.7030	1256.7117
21	S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	C ₄₉ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₁	97.7	987.5178	987.5214
22	K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	C ₄₀ H ₅₇ N ₇ O ₈	99.4	763.4269	763.4318
23	P-Nle-P-Tyr(OBn)	C ₃₂ H ₄₂ N ₄ O ₆	98.0	578.3104	578.3126

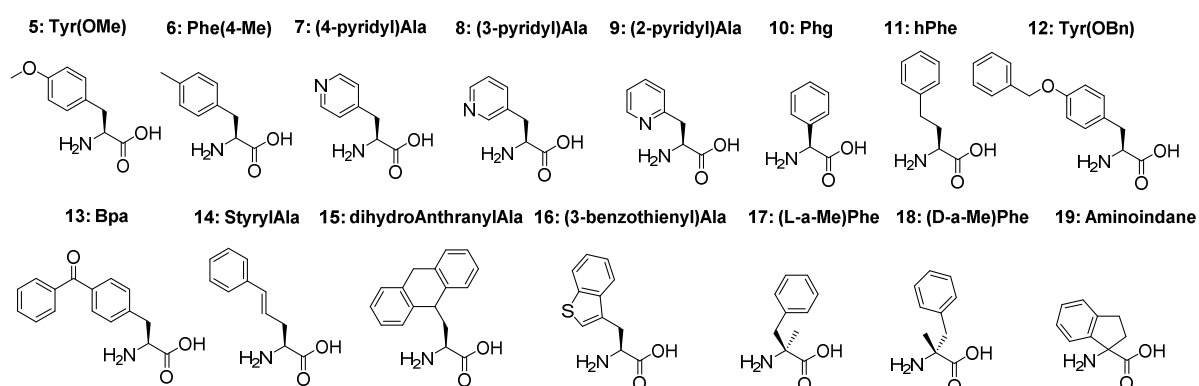
[a] Purity determined by HPLC-UV at 223 nm. [b] Exact mass determined by High Resolution Mass Spectrometry (HRMS).

(Pyridyl)Ala replacements (**7**, IC₅₀ 1.3 nM; **8**, IC₅₀ 1.6 nM; **9**, IC₅₀ 6.1 nM) provided affinities close to the parent peptide. To further probe the existence of putative π - π interactions between the C-terminal amino acid of apelin-13 and the APJ receptor, the electron density of the aryl group of Phe¹³ and its distance from the backbone of the peptide were varied. Thus, phenylglycine (Phg) analog **10**, elicited a 10-fold loss on binding affinity (IC₅₀ 14.3 nM), underlining that C-terminal side chain distance from the backbone of apelin-13 may be critical for interaction with the APJ receptor.

Table 2. Phe¹³ modified analogs of apelin-13 and results on binding affinity and functional assays

N°	Sequence	Binding IC ₅₀ (nM) ^[a]	cAMP EC ₅₀ (nM) ^[b]	Gα _i EC ₅₀ (nM) ^[c]
1	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.84 ± 0.25
2	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-I	11.4 ± 1.0	3.1 ± 0.5	2.5 ± 1.1
3	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-L	7.9 ± 0.8	2.9 ± 0.5	1.3 ± 0.5
4	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-V	18.2 ± 3.2	4.7 ± 1.3	2.7 ± 1.5
5	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OMe)	0.60 ± 0.05	0.23 ± 0.05	1.3 ± 0.6
6	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phe(4-Me)	0.25 ± 0.02	0.17 ± 0.1	1.4 ± 0.9
7	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-pyridyl)Ala	1.3 ± 0.2	0.45 ± 0.1	0.73 ± 0.46
8	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-pyridyl)Ala	1.6 ± 0.1	2.3 ± 1.0	2.0 ± 1.3
9	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(2-pyridyl)Ala	6.1 ± 1.0	3.6 ± 1.4	3.0 ± 1.4
10	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phg	14.3 ± 1.4	2.7 ± 0.4	4.2 ± 2.0
11	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-hPhe	6.7 ± 1.1	0.24 ± 0.06	1.4 ± 0.5
12	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	0.02 ± 0.003	0.35 ± 0.09	1.1 ± 0.5
13	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bpa	0.48 ± 0.05	0.04 ± 0.02	0.91 ± 0.32
14	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-StyrylAla	1.5 ± 0.2	0.63 ± 0.2	3.4 ± 2.4
15	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-dihydroAnthranlylAla	13.7 ± 1.6	95 ± 19	6.0 ± 2.4
16	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-benzothieryl)Ala	2.8 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.3 ± 1.2
17	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(L-α-Me)Phe	0.43 ± 0.03	0.07 ± 0.02	2.7 ± 1.1
18	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(D-α-Me)Phe	0.86 ± 0.16	0.86 ± 0.17	2.8 ± 0.5
19	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Aminoindane	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.8

[a] Concentration producing 50% competitive inhibition of binding of apelin radioligand [¹²⁵I]-apelin-13, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [b] Concentration that produces 50% inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations. [c] Concentration that produces 50% dissociation of Gα_i subunit as observed in BRET assay, values represent the mean ± S.E.M. of three determinations.

**Figure 1.** Chemical structures of unnatural amino acids used in this study.

Increasing electron density and steric hindrance of the C-terminal residue (**11** - **19**) led to very potent analogs. Indeed, Tyr(OBn) modification **12** induced a 60-fold improvement on binding affinity versus the native peptide (IC₅₀ 0.02 vs 1.2 nM), making it the most potent APJ ligand reported to date. On the other hand, introduction of dihydroAnthranlylAla moiety **15**, which possesses a higher volume and π -stacking abilities, provoked a >10-fold loss compared to apelin-13 (IC₅₀ 13.7 nM), suggesting that there is a limit in terms of steric hindrance in the interaction with APJ. We were further interested in assessing the

pharmacodynamic impact of a di-substitution on α -carbon. To this end, residue Phe¹³ was replaced by (L- α -Me)Phe, (D- α -Me)Phe, and aminoindane (**17**, IC₅₀ 0.43 nM; **18**, IC₅₀ 0.86 nM; **19**, IC₅₀ 1.7 nM, respectively). These analogs exhibited IC₅₀ close to that of apelin-13, suggesting that substitution of the C α atom has a neutral effect on interactions with APJ.

Effects of apelin-13 Phe¹³ modifications on cAMP inhibition and G α_{i1} activation

The new analogs were then tested for their ability to inhibit forskolin-induced cAMP accumulation and to activate G α_{i1} dissociation using Fluorescence and Bioluminescence Resonance Energy Transfer assays (FRET and BRET)⁴⁰ (Table 2, Figure 2). Mostly, the effect of modifications in position 13 on these two pathways generally followed trends observed in binding affinities. However, several analogs diverged from this trend, revealing that the C-terminal position of apelin-13 could also be involved in fine-tuning of the cAMP canonical pathway. Indeed, replacement of Phe¹³ with Phg, analog **10**, with a 10-fold loss on binding still possessed a cAMP potency (EC₅₀ 2.7 nM) close to that of the parent peptide (**1**, EC₅₀ 1.4 nM). Likewise, homo-phenylalanine (hPhe), analog **11**, displayed an interesting improvement in cAMP potency (EC₅₀ 0.24 nM) compared to apelin-13, despite a decreased affinity (IC₅₀ 6.7 nM). Substitution of residue Phe¹³ by Bpa (**13**) or (L- α -Me)Phe (**17**) led to the two most potent analogs of apelin-13 described in the literature, exhibiting around 30-fold improvement on inhibition of cAMP production (**13**, EC₅₀ 0.04 nM; **17**, EC₅₀ 0.07 nM) compared to the native peptide. In contrast, the ability of Phe¹³ dihydroAnthranilAla (**15**) to inhibit cAMP accumulation (EC₅₀ 95 nM) was reduced by almost two orders of magnitude compared to apelin-13 despite a high binding affinity, which makes it an interesting pharmacological probe. An explanation could be related to the Black & Leff model⁴⁶ describing the relationship between biological responses and occupancy rate of a receptor (aka the "occupancy theory"), which states that some analogs could elicit a percentage of biological response higher than the percentage of receptor occupancy.⁴⁷ These experimental observations still remain difficult to rationalize.

The dissociation of G α_{i1} from G $\beta\gamma$ subunits induced by C-terminally modified analogs was also assessed using a BRET-based biosensor.⁴⁸ Typically, Phe¹³ replacements led to low nanomolar potency on the G α_{i1} pathway close to apelin-13 (**1**, EC₅₀ 0.84 nM), suggesting

that the C-terminal moiety of apelin-13 is not capital for $G\alpha_{i1}$ dissociation with the $G\beta\gamma$ subunits (**Table 2, Figure 2**). $G\alpha_{i1}$ engagement would be expected to be correlated with the downstream inhibition of cAMP production. Nevertheless, several analogs showed remarkable disparities, suggesting that inhibition of cAMP production may also occur through another G-protein subtype or even through a G-protein-independent mechanism. The (L- α -Me)Phe (**17**) is 40-fold less potent to activate $G\alpha_{i1}$ than to decrease cAMP production ($G\alpha_{i1}$ EC₅₀ 2.7 nM vs. cAMP EC₅₀ 0.07 nM). Furthermore, to a lesser extent, this observation held true when residue Phe¹³ was substituted by Bpa (**13**, $G\alpha_{i1}$ EC₅₀ 0.91 nM vs. cAMP EC₅₀ 0.04 nM). The structural differences between Bpa and (L- α -Me)Phe side-chains are obvious. However, both compounds were effective in activating a cAMP-dependent pathway, possibly via an alternative mechanism involving the recruitment of other G protein subunits. Indeed, the adenylate cyclase (AC), which possesses nine isoforms in human,⁴⁹ is responsible for the conversion of ATP into cAMP and can be inhibited through various G protein-dependent mechanisms.⁵⁰ Other α subunits such as $G\alpha_{i2,3}$ or $G\alpha_o$ as well as the $G\beta\gamma$ subunits were demonstrated, in some cases, to have the ability to reduce intracellular levels of cAMP.^{51,52} In contrast, Phe¹³dihydroAnthranlyl (**15**), which exhibited an important loss on cAMP production inhibition, engaged $G\alpha_{i1}$ similarly to apelin-13 ($G\alpha_{i1}$ EC₅₀ 6.0 nM vs. cAMP EC₅₀ 95 nM). This observation also leads to the hypothesis that $G\alpha_{i2,3}$ and/or $G\alpha_o$ would trigger the inhibition of cAMP production by apelin analogs in HEK293 cells.

N-terminal truncated analogs of Tyr(OBn) (12) exhibit drastic decrease in receptor binding

Substitution of residue Phe¹³ of apelin-13 by Tyr(OBn) (**12**) significantly improved its binding affinity to APJ (IC₅₀ 20 pM). It is now accepted that the N-terminal fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ is an important pharmacophore.^{6,31} The next question was whether the improved potency due to Tyr(OBn) could outweigh the contribution of N-terminal pharmacophoric elements. Thus, analog **12** was sequentially truncated starting from its N-terminal (**Table 3**). Deletions of the Pyr¹-Arg²-Pro³ amino acids dramatically decreased affinity for APJ (**20**, IC₅₀ 57 nM vs. **12**, IC₅₀ 0.02 nM). This 2800-fold loss was unexpected

since Medhurst and coworkers described that the mutation Arg²Ala of apelin-13 only led to a 50-fold decrease compared to the parent peptide.⁶ The Pyr¹ residue has no crucial role for interaction with APJ, suggesting that the absence of Pro³ could be responsible for this considerable loss. Indeed, NMR studies revealed the high level of rigidity within the Arg²→Leu⁵ fragment, where Pro³ seems to be structuring.³¹ Thus, our results strengthen conclusions drawn from the previous works. Moreover, deletion of Arg⁴-Leu⁵ amino acids completely abrogated binding (**21**, IC₅₀ > 10 μM). As expected, more heavily truncated analogs, **22** and **23**, also exhibited affinities > 10 μM.

Table 3. Truncated derivatives of the Tyr(OBn) analog		
N°	Sequence	Binding IC₅₀ (nM)^[a]
12	Pyr-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	0.02 ± 0.003
20	R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	57 ± 11
21	S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	> 10 000
22	K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)	> 10 000
23	P-Nle-P-Tyr(OBn)	> 10 000
^[a] Concentration producing 50% competitive inhibition of binding of apelin radioligand [¹²⁵ I]-apelin-13, values represent the mean ± S.E.M. of two determinations.		

Signaling signature and hypotensive effects of apelin-13 and the Tyr(OBn) analog (12)

We investigated further the signaling pathways triggered by the high-affinity analog Tyr(OBn) (**12**) using BRET biosensors. Indeed, we evaluated the engagement of Gα_{i1} and Gα_{oA} subunits as well as the recruitment of proteins involved in GPCR internalization, β-arrestin1 and β-arrestin2 (**Figure 2**). Whereas compound **12** induced an activation of the Gα_{i1} subunit and a recruitment of β-arrestin2 close to that elicited by apelin-13 (**Figure 2C & 2F**), the inhibition of cAMP accumulation, the engagement of Gα_{oA} subunit and the recruitment of β-arrestin1 induced by (**12**) appeared to be more potent as represented by the concentration-response curves (**Figures 2B, 2D & 2E**). **Figure 2A** recapitulates potencies (EC₅₀) on the five signaling pathways tested. Interestingly, analog **12** which induced a 60-fold improvement in binding affinity versus apelin-13, did not possess increased potency on those signaling pathways in the same proportions.

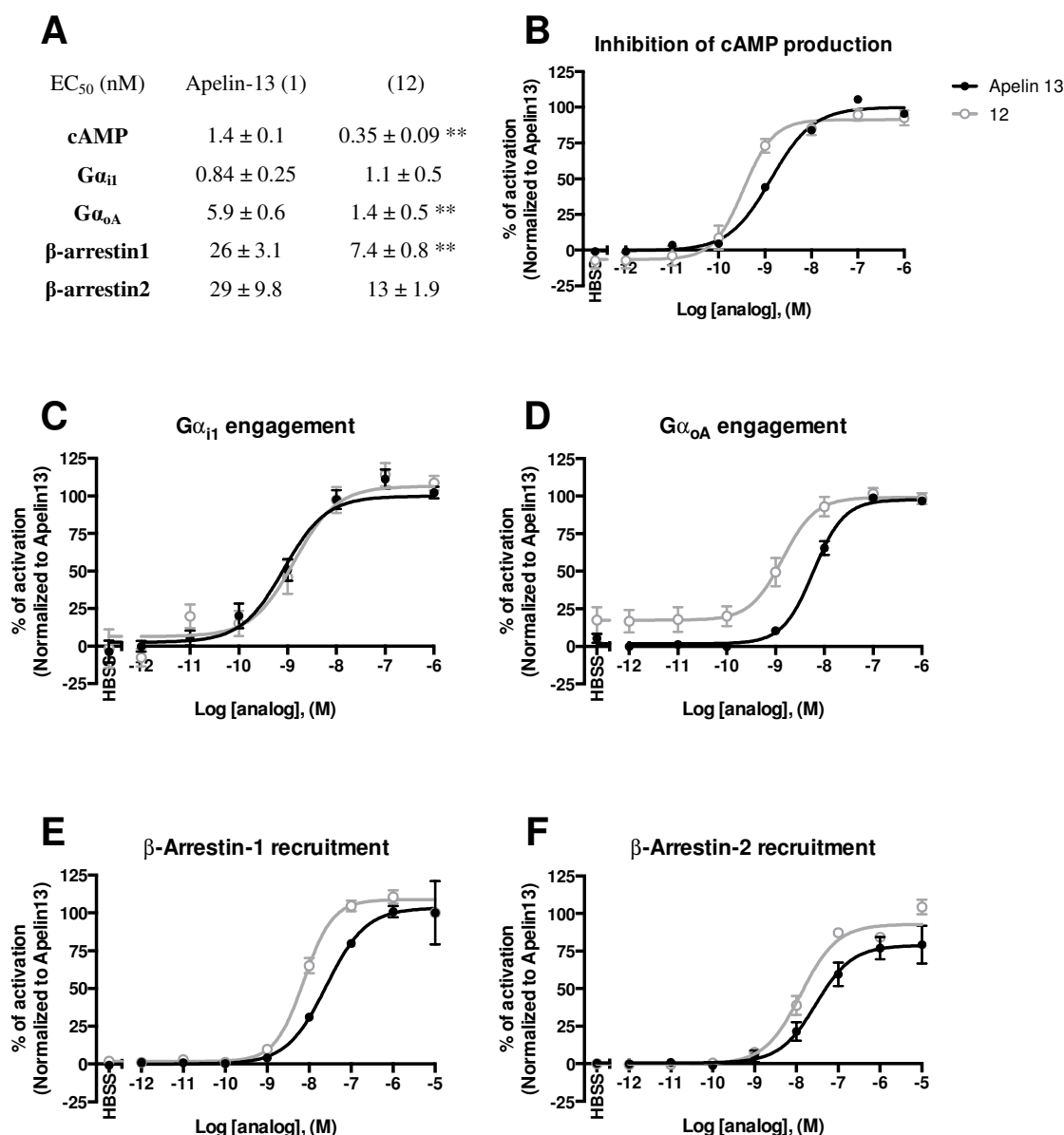


Figure 2. Potency (EC₅₀) and concentration-response curves of apelin-13 and Tyr(OBn) analog **12** on cAMP production, Gα_{i/o} engagement and β-arrestins recruitment. (A) EC₅₀ of apelin-13 and compound **12** are represented. Concentration-response relationships of apelin-13 and (**12**) for their ability: (B) to inhibit the forskolin-induced cAMP production; (C) to engage Gα_{il} and; (D) to engage Gα_{oA}. Apelin-13 and **12** were also assessed for their ability to trigger the recruitment of: (E) β-arrestin1 and; (F) β-arrestin2. Statistical analyses were performed with a two tailed Student t-test. ** p < 0.01 vs. apelin-13.

The C-terminal amino acid was demonstrated to be capital for the hypotensive effect of apelin in spontaneously hypertensive rats, since its substitution by alanine or its deletion abrogated the reduction in mean arterial pressure (MAP).²³ The aromatic side chain of

Phe¹³ seems to play a central role in this phenomenon. In order to assess the influence of the Tyr(OBn) replacement on MAP, apelin-13 and analog **12** were intravenously administered at doses of 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg/kg into Sprague-Dawley rats, then every 30 seconds the systolic, diastolic, and mean arterial pressure were measured by the tail-cuff method using a non-invasive blood pressure system (**Figure 3**).⁵³

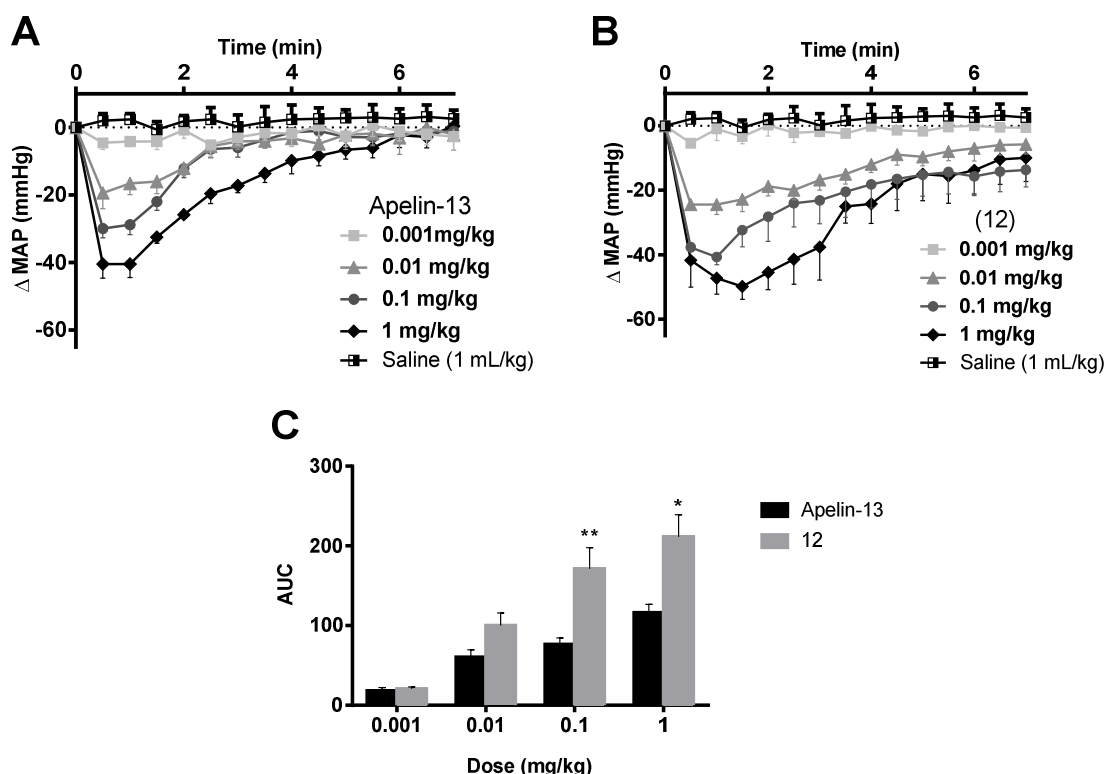


Figure 3. Effects of apelin-13 and Tyr(OBn) analog **12** on blood pressure in anesthetized rats. Tracings depicting the hypotensive effects of (A) apelin-13 and (B) **12** in rats, when given as a bolus via the tail vein. (C) Histograms showing the area under the curve (AUC) of the mean arterial pressure (MAP) decrease induced by administration of increasing doses (0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg/kg) of apelin-13 and **12**. Each bar represents the average value \pm S.E.M. obtained with 6–8 animals. Statistical analyses were performed with a Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. apelin-13.

Dose-response curves revealed that injection of apelin-13 lowered MAP in a dose-dependent manner, the maximum hypotensive effect was reached rapidly 1 minute after administration (**Figure 3A**). Apelin-13 induced 40, 30, and 20 mmHg decrease in MAP at doses of 1, 0.1, and 0.01 mg/kg, respectively.⁵⁴ At equal dose, analog **12** caused a marked reduction in MAP compared to apelin-13 (**Figure 3B**). Statistical analysis demonstrated

that the MAP decrease was both stronger and more sustained for the Tyr(OBn) analog compared to apelin-13, as demonstrated by the determination of the area under the curve (AUC) for analog **12** at doses 0.1 and 1 mg/kg (**Figure 3C**). This may be attributed to improved stability of (**12**) compared to (**1**). Indeed, we previously demonstrated that the plasma stability of C-terminally modified analogs of apelin-13 possessed drastically increased plasma half-life.⁴¹ Particularly, the half-life of Tyr(OBn) analog **12** was superior to 1h ($t_{1/2}$ 66 min) whereas that of apelin-13 was close to 14 min in rat plasma. Recently, Ceraudo and co-workers suggested that the signaling pathways involved in apelin-17-induced MAP could be β -arrestin-dependent.⁴⁰ The significantly higher potency of β -arrestin1 recruitment elicited by analog **12** (β -arr1 EC_{50} 7.4 nM) compared to apelin-13 (β -arr1 EC_{50} 26 nM) (**Figure 2A**) supports this observation. Thus, analog **12** represents a more stable pharmacological tool that will help us better understand the link between chemical structure, receptor signaling, and physiological function.

CONCLUSION

In this study, we report C-terminally modified analogs of apelin-13, with a particular focus on diverse unnatural aromatic amino acids as probes to further investigate the impact on binding, inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation, activation of $G\alpha_{i1}$ subunit and *in vivo* activity. This led to the discovery of new analogs of apelin-13 possessing pM-level binding and inhibition of cAMP production. Substitutions of residue Phe¹³ by Bpa or (L- α -Me)Phe provided potent compounds exhibiting 30-fold improvement in inhibiting cAMP production and having high affinities for APJ. Furthermore, analog (F¹³Tyr(OBn) apelin-13 possesses the strongest binding affinity for APJ reported to date (IC_{50} 20 pM), 60-fold higher compared to the parent peptide. The latter was subsequently assessed for its ability to engage $G\alpha_{oA}$ subunit and to recruit β -arrestin1 and β -arrestin2. While its potency to recruit β -arrestin2 and to activate $G\alpha_{i1}$ proteins was close to that of apelin-13, the Tyr(OBn) modification improved significantly the efficacy to inhibit cAMP production, to engage $G\alpha_{oA}$ subunit and to recruit β -arrestin1. Finally, apelin-13 and its Tyr(OBn)¹³ analog were administered to anesthetized rats to assess the impact on blood pressure. Tyr(OBn)¹³ analog **12** lowered mean arterial blood pressure more robustly than apelin-13. Moreover, the hypotensive action of (**12**) was more sustained in time, an

observation tentatively attributed to improved plasma stability compared to apelin-13. This study further supports previous works suggesting that the C-terminal amino acid is crucial for the hypotensive action of apelin. Overall, the analogs reported in this study constitute very interesting pharmacological tools to better understand the signaling pathways involved in the hypotensive effects and the physiological roles of the apelinergetic system, as well as its ultimate validation as a pharmacological target for the treatment of cardiovascular diseases.

EXPERIMENTAL SECTION

Procedures for solid phase synthesis

Materials

Protected amino acids and TentaGel S PHB, O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]polyethylene glycol resin were purchased from ChemImpex International (USA). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Canada), Fisher Scientific (USA) or ACP (Canada), were of the highest commercially available purity and were used as such. Peptide synthesis was performed in 12 mL polypropylene cartridge with 20 μ m PE frit from Applied Separations (USA).

Peptide synthesis

TentaGel S PHB, O-[4-(Hydroxymethyl)phenyl]polyethylene glycol resin (0.27 mmol/g, 0.2 g) was treated with triphenylphosphine (5 equiv.), diisopropylazodicarboxylate (DIAD, 5 equiv.), Fmoc-protected amino acid (5 equiv.) in tetrahydrofuran (THF, 4 mL). The mixture was shaken overnight on an orbital shake at room temperature, then the resin was sequentially washed for 3-min periods with DCM (2x 5 mL), toluene (1x 5 mL), EtOH (1x 5 mL), toluene (1x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 1x 5 mL), THF/MeOH (75/25, 1x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 1x 5 mL), THF/MeOH (75/25, 1x 5 mL), DCM (2x 5 mL). The resin was then capped with DCM/Ac₂O/DIPEA (20/5/1, v/v/v, 5 mL) at room temperature during 1 h, and washed with DCM (3x 5 mL), DCM/MeOH (75/25, 5 mL), DCM (3x 5 mL). After Fmoc deprotection with 20% piperidine/DMF (*N,N*-dimethylformamide) during 15 min, the

following Fmoc-protected amino acid (5 equiv.) was attached in the presence of [O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] HATU (5 equiv.), *N,N*-diisopropylethylamine (10 equiv.) in DMF (4 mL). Coupling reaction was run for 30 min at room temperature, then piperidine (20% in DMF) was used to deprotect the Fmoc group at every step. The resin was washed after each coupling step and deprotection with DCM (2x 5 mL), 2-propanol (1x 5 mL), DCM (1x 5 mL), 2-propanol (1x 5 mL), DCM (2x 5 mL). For resin cleavage, the resin was treated with a mixture of TFA (trifluoroacetic acid)/H₂O/TIPS (triisopropylsilane), 95/2.5/2.5, v/v] (4 mL / 0.2 g of resin) for 4 h at room temperature. After filtration, peptide was precipitated in TBME (*tert*-butyl methyl ether) at 0°C, the suspension was centrifuged, the supernatant was removed and the crude product was re-dissolved in water. Purification by reverse-phase HPLC yielded the desired products as white powders after lyophilization.

Peptide purification and characterization

Crude peptides were purified by reverse-phase chromatography using a preparative HPLC from Waters (Autosampler 2707, Quaternary gradient module 2535, UV detector 2489, fraction collector WFCIII) equipped with an ACE5 C₁₈ column (250 x 21.2 mm, 5 µm spherical particle size) and water + 0.1% TFA and acetonitrile as eluents. Analytical HPLC chromatograms were recorded on an Agilent 1100 series equipped with UV detector set at 223 nm and an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (3.0 x 50 mm, 2.7 µm spherical particle size column) using the following method (0→10 min: 2→50% acetonitrile; 10→14 min: 50→100%; 14→18 min: 100%; 18→19 min: 100→2%; 19→24 min: 2%). All analogs possessed UV purity >95% at 223 nm. Molecular weights of analogs were determined by mass spectrometry (Electrospray infusion ESI-Q-Tof from Maxis).

Binding and cAMP accumulation

Materials

High glucose Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), G418 and penicillin/streptomycin were purchased from Invitrogen Life Technologies (Canada). Fetal bovine serum (FBS) and Hank's balanced saline solution (HBSS) were purchased from

Wisent (Canada) and bovine serum albumin (BSA) was purchased from BioShop (Canada). 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and forskolin were purchased from Sigma-Aldrich (Canada). [125 I]-apelin13, white opaque 96-well half area plates, OptiPlate™-384 white opaque microplates and LANCE®*Ultra* cAMP kit were purchased from PerkinElmer (Canada). Polyethylenimine (branched PEI) was obtained from Polysciences (USA). Coelenterazine-400A (DeepBlueC) was purchased from Biosynth International Inc. (USA). BRET² measurements were performed on an M1000 plate reader from Tecan (USA).

Cell culture

Stably transfected HEK293 cells expressing the YFP epitope-tagged human APJ receptor were cultured in high glucose Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C according to the manufacturer's instructions. G418 and penicillin/streptomycin were used as selection agent and antibiotics, respectively.

Radioligand binding

HEK293 cells expressing the YFP epitope-tagged human APJ receptor were washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were then gently scraped in resuspension buffer (1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), centrifuged at 3500 g for 15 min at 4°C and resuspended in binding buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.2% BSA). Competition radioligand binding experiments were performed by incubating cell membranes (15 µg) with 0.2 nM [125 I]-apelin-13 (2200 ci/mmol) and increasing concentrations of various apelin analogs (10^{-12} to 10^{-6} M) for 1 h at room temperature in a final volume of 200 µL. Bound radioactivity was separated from free ligand by filtration through glass fiber filter plates (Millipore, Billerica, MA) pre-soaked for 1 h in PEI 0.2% at 4°C and washed 3 times with 170 µL of ice-cold washing buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.2% BSA). Receptor-bound radioactivity was counted in a γ -counter 1470 Wizard form PerkinElmer (80% counting efficiency). Nonspecific binding was measured in the presence of 10^{-5} M unlabeled apelin-13 and represented less than 5% of total binding. IC₅₀ values were determined from inhibition curves as the unlabeled ligand concentration inhibiting 50% of [125 I]-apelin13 specific binding. All binding data were

calculated and plotted using GraphPad Prism 6 and represent the mean \pm S.E.M. of three determinations.

Measurement of cAMP production

Intracellular cAMP production was determined using PerkinElmer's LANCE[®] Ultra cAMP kit and following manufacturer's recommendations. Assays were performed in OptiPlate[™]-384 white opaque microplates. The stimulation buffer used for assays contained 1X HBSS, 0.5 mM IBMX and 0.1% BSA (pH 7.4). Cells (4 μ L), at concentrations of 750 cells/well in stimulation buffer, were plated followed by forskolin (2 μ L) at 1 μ M in stimulation buffer. Increasing concentrations (10^{-12} to 10^{-6} M) of ligands (2 μ L) were then added and the microplate was incubated at 37°C for 30 min. After stimulation, cells were lysed by successive additions of the Eu-cAMP tracer (4 μ L) and the ULight-cAMP mAb (4 μ L) prepared in the cAMP Detection Buffer provided with the kit followed by a 1h incubation at room temperature with a TopSeal. Total assay volume was 16 μ L. TR-FRET signal at 665 nm was measured on a M1000 plate reader. Data were calculated and plotted using GraphPad Prism 6 and represent the mean \pm SEM of at least three separate determinations.

G α_{iL} , G α_{oA} engagement and β -arrestins recruitment

Cell culture and transfections

HEK 293 cells were allowed to grow in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 20 mM HEPES at 37°C in a humidified chamber at 5% CO₂. All transfections were carried out with polyethyleneimine as previously described.⁵⁵

G-Protein engagement and β -arrestin recruitment

HEK293 cells were seeded in T175 flasks. 24h after, cells were transfected with the plasmids coding for hAPJ, G α_{i1} -RlucII(91) or G α_{oA} -RlucII(99), GFP10-G γ_1 , and G β_1 or for hAPJ-GFP10 and RlucII- β -arrestin 1 or 2.

BRET Experiments

24h after transfection, cells were seeded into white 96 well plates (BD Flacon) at a concentration of 50000 cells/well and incubated at 37°C overnight. Cells were washed with PBS and 90µL of HBSS was added in each well. Cells were then stimulated with the analog at concentrations ranging from 10^{-6} M to 10^{-12} M for 5 min at 37°C (G-Proteins) or for 30 min at room temperature (β -arrestins). After stimulation time, 5 µM of coelenterazine 400A was added to each well and the plate was read using the BRET² filter set of a GeniosPro plate reader (Tecan, Austria). The BRET² ratio was determined as GFP10_{em}/RlucII_{em}. Data were plotted and EC₅₀ values were determined by using GraphPad Prism 6. Each data point represent the mean \pm SEM of at least three different experiments each done in triplicate.

Blood pressure measurement

Animals

Adult male Sprague Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*. The experimental procedures in this study were approved by the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke and were in accordance with policies and directives of the Canadian Council on Animal Care.

Hypotensive effects

Sprague-Dawley male rats (300-400g) were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (87:13 mg/kg intramuscular) and placed on a heating pad. Then, the systolic, diastolic, and mean arterial pressures were measured every 30 seconds by the tail-cuff method, using the CODA Blood Pressure System (Kent Scientific Co., Connecticut, USA). When the blood pressure has stabilized (five consecutive measure with less than 5% variability), apelin-13 or Tyr(OBn) analog **12** (0.001, 0.01, 0.1, or 1 mg/kg, in 300 µL of saline) was injected via the tail vein. Blood pressure measurements were acquired for seven minutes following the injection.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from Université de Sherbrooke, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Collaborative Research & Development Grant with Tranzyme Pharma), Tranzyme Pharma, and the FRQS-funded Réseau Québécois de Recherche sur le Médicament (RQRM) is acknowledged. The Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS) and the FRQNT-funded Proteo network are also acknowledged for scholarship and travel grants to A.M. P.S. is the recipient of the Canada Research Chair in Neurophysiopharmacology of Chronic Pain.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Analytical high performance liquid chromatography (HPLC) and high-resolution mass spectrometry (HRMS) spectra of the different compounds described in this manuscript are presented in the supporting information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- (1) O'Dowd, B. F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H. H.; Tsui, L. C.; Kennedy, J. L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S. R.; Nguyen, T. A Human Gene That Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome 11. *Gene* **1993**, *136*, 355–360.
- (2) De Mota, N.; Reaux-Le Goazigo, A.; El Messari, S.; Chartrel, N.; Roesch, D.; Dujardin, C.; Kordon, C.; Vaudry, H.; Moos, F.; Llorens-Cortes, C. Apelin, a Potent Diuretic Neuropeptide Counteracting Vasopressin Actions through Inhibition of Vasopressin Neuron Activity and Vasopressin Release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10464–10469.
- (3) Zhen, E. Y.; Higgs, R. E.; Gutierrez, J. a. Pyroglutamyl Apelin-13 Identified as the Major Apelin Isoform in Human Plasma. *Anal. Biochem.* **2013**, *442*, 1–9.
- (4) O'Carroll, a M.; Selby, T. L.; Palkovits, M.; Lolait, S. J. Distribution of mRNA Encoding B78/apj, the Rat Homologue of the Human APJ Receptor, and Its Endogenous Ligand Apelin in Brain and Peripheral Tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1492*, 72–80.
- (5) Hosoya, M.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Fujii, R.; Habata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Honda, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; et al. Molecular and Functional Characteristics of APJ. Tissue Distribution of mRNA and Interaction with the Endogenous Ligand Apelin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21061–21067.
- (6) Medhurst, A. D.; Jennings, C. a.; Robbins, M. J.; Davis, R. P.; Ellis, C.; Winborn, K. Y.; Lawrie, K. W. M.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J. E.; et al. Pharmacological and Immunohistochemical Characterization of the APJ Receptor and Its Endogenous Ligand Apelin. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 1162–1172.

- (7) Lee, D. K.; Cheng, R.; Nguyen, T.; Fan, T.; Kariyawasam, a P.; Liu, Y.; Osmond, D. H.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 34–41.
- (8) Reaux, a; De Mota, N.; Skultetyova, I.; Lenkei, Z.; El Messari, S.; Gallatz, K.; Corvol, P.; Palkovits, M.; Llorens-Cortès, C. Physiological Role of a Novel Neuropeptide, Apelin, and Its Receptor in the Rat Brain. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 1085–1096.
- (9) Falcão-Pires, I.; Ladeiras-Lopes, R.; Leite-Moreira, A. F. The Apelinergic System: A Promising Therapeutic Target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 633–645.
- (10) O'Carroll, A.-M.; Lolait, S. J.; Harris, L. E.; Pope, G. R. The Apelin Receptor APJ: Journey from an Orphan to a Multifaceted Regulator of Homeostasis. *J. Endocrinol.* **2013**, *219*, R13–R35.
- (11) Scimia, M. C.; Hurtado, C.; Ray, S.; Metzler, S.; Wei, K.; Wang, J.; Woods, C. E.; Purcell, N. H.; Catalucci, D.; Akasaka, T.; et al. APJ Acts as a Dual Receptor in Cardiac Hypertrophy. *Nature* **2012**, *488*, 394–398.
- (12) Szokodi, I.; Tavi, P.; Földes, G.; Voutilainen-Myllylä, S.; Ilves, M.; Tokola, H.; Pikkarainen, S.; Piuholo, J.; Rysä, J.; Tóth, M.; et al. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 434–440.
- (13) Berry, M. F.; Pirollo, T. J.; Jayasankar, V.; Burdick, J.; Morine, K. J.; Gardner, T. J.; Woo, Y. J. Apelin Has in Vivo Inotropic Effects on Normal and Failing Hearts. *Circulation* **2004**, *110*, II187–II193.
- (14) Chamberland, C.; Barajas-Martinez, H.; Haufe, V.; Fecteau, M.-H.; Delabre, J.-F.; Burashnikov, A.; Antzelevitch, C.; Lesur, O.; Chraïbi, A.; Sarret, P.; et al. Modulation of Canine Cardiac Sodium Current by Apelin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 694–701.

- (15) Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M. X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; et al. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471–476.
- (16) El Messari, S.; Iturrioz, X.; Fassot, C.; De Mota, N.; Roesch, D.; Llorens-Cortes, C. Functional Dissociation of Apelin Receptor Signaling and Endocytosis: Implications for the Effects of Apelin on Arterial Blood Pressure. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 1290–1301.
- (17) Kuba, K.; Zhang, L.; Imai, Y.; Arab, S.; Chen, M.; Maekawa, Y.; Leschnik, M.; Leibbrandt, A.; Markovic, M.; Makovic, M.; et al. Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated with Aging and Pressure Overload. *Circ. Res.* **2007**, *101*, e32–e42.
- (18) Charles, C. J. Update on Apelin Peptides as Putative Targets for Cardiovascular Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 633–644.
- (19) Japp, A. G.; Cruden, N. L.; Amer, D. a B.; Li, V. K. Y.; Goudie, E. B.; Johnston, N. R.; Sharma, S.; Neilson, I.; Webb, D. J.; Megson, I. L.; et al. Vascular Effects of Apelin in Vivo in Man. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 908–913.
- (20) Japp, a G.; Cruden, N. L.; Barnes, G.; van Gemeren, N.; Mathews, J.; Adamson, J.; Johnston, N. R.; Denvir, M. a; Megson, I. L.; Flapan, a D.; et al. Acute Cardiovascular Effects of Apelin in Humans: Potential Role in Patients with Chronic Heart Failure. *Circulation* **2010**, *121*, 1818–1827.
- (21) Barnes, G. D.; Alam, S.; Carter, G.; Pedersen, C. M.; Lee, K. M.; Hubbard, T. J.; Veitch, S.; Jeong, H.; White, A.; Cruden, N. L.; et al. Sustained Cardiovascular Actions of APJ Agonism during Renin-Angiotensin System Activation and in Patients with Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **2013**, *6*, 482–491.

- (22) Scimia, M. C.; Blass, B. E.; Koch, W. J. Apelin Receptor: Its Responsiveness to Stretch Mechanisms and Its Potential for Cardiovascular Therapy. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 733–741.
- (23) Lee, D. K.; Saldivia, V. R.; Nguyen, T.; Cheng, R.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Modification of the Terminal Residue of Apelin-13 Antagonizes Its Hypotensive Action. *Endocrinology* **2005**, *146*, 231–236.
- (24) Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; et al. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14838–14843.
- (25) Yue, P.; Jin, H.; Xu, S.; Aillaud, M.; Deng, A. C.; Azuma, J.; Kundu, R. K.; Reaven, G. M.; Quertermous, T.; Tsao, P. S. Apelin Decreases Lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* **2011**, *152*, 59–68.
- (26) Li, Y.; Chen, J.; Bai, B.; Du, H.; Liu, Y.; Liu, H. Heterodimerization of Human Apelin and Kappa Opioid Receptors: Roles in Signal Transduction. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 991–1001.
- (27) Bai, B.; Tang, J.; Liu, H.; Chen, J.; Li, Y.; Song, W. Apelin-13 Induces ERK1/2 but Not p38 MAPK Activation through Coupling of the Human Apelin Receptor to the Gi2 Pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2008**, *40*, 311–318.
- (28) Masri, B.; Morin, N.; Pedebernade, L.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. The Apelin Receptor Is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18317–18326.
- (29) Habata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kawamata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Nishizawa, N.; Murosaki, S.; Kurokawa, T.; et al. Apelin, the Natural Ligand of the Orphan Receptor APJ, Is Abundantly Secreted in the Colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1452*, 25–35.

- (30) Lee, D. K.; Ferguson, S. S. G.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. The Fate of the Internalized Apelin Receptor Is Determined by Different Isoforms of Apelin Mediating Differential Interaction with Beta-Arrestin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 185–189.
- (31) Langelaan, D. N.; Bebbington, E. M.; Reddy, T.; Rainey, J. K. Structural Insight into G-Protein Coupled Receptor Binding by Apelin. *Biochemistry* **2009**, *48*, 537–548.
- (32) Fan, X.; Zhou, N.; Zhang, X.; Mukhtar, M.; Lu, Z.; Fang, J.; DuBois, G. C.; Pomerantz, R. J. Structural and Functional Study of the Apelin-13 Peptide, an Endogenous Ligand of the HIV-1 Coreceptor, APJ. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10163–10168.
- (33) Hamada, J.; Kimura, J.; Ishida, J.; Kohda, T.; Morishita, S.; Ichihara, S.; Fukamizu, A. Evaluation of Novel Cyclic Analogues of Apelin. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 547–552.
- (34) Macaluso, N. J. M.; Glen, R. C. Exploring the “RPRL” Motif of Apelin-13 through Molecular Simulation and Biological Evaluation of Cyclic Peptide Analogues. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1247–1253.
- (35) Macaluso, N. J. M.; Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Davenport, A. P.; Glen, R. C. Discovery of a Competitive Apelin Receptor (APJ) Antagonist. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1017–1023.
- (36) Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; De Mota, N.; Franchet, C.; Guillier, F.; Leroux, V.; Dabire, H.; Le Jouan, M.; Chabane, H.; Gerbier, R.; et al. Identification and Pharmacological Properties of E339-3D6, the First Nonpeptidic Apelin Receptor Agonist. *FASEB J.* **2010**, *24*, 1506–1517.
- (37) Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; Marsol, C.; Riché, S.; Chabane, H.; Tounsi, N.; Kuhry, M.; Heissler, D.; Hibert, M.; et al. Structure-Activity Relationship Studies toward the Discovery of Selective Apelin Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2014**.

- (38) Langelaan, D. N.; Reddy, T.; Banks, A. W.; Dellaire, G.; Dupré, D. J.; Rainey, J. K. Structural Features of the Apelin Receptor N-Terminal Tail and First Transmembrane Segment Implicated in Ligand Binding and Receptor Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1828, 1471–1483.
- (39) Iturrioz, X.; Gerbier, R.; Leroux, V.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C. By Interacting with the C-Terminal Phe of Apelin, Phe255 and Trp259 in Helix VI of the Apelin Receptor Are Critical for Internalization. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 32627–32637.
- (40) Ceraudo, E.; Galanth, C.; Carpentier, E.; Banegas-Font, I.; Schonegge, A.-M.; Alvear-Perez, R.; Iturrioz, X.; Bouvier, M.; Llorens-Cortes, C. Biased Signaling Favoring Gi over B-Arrestin Promoted by an Apelin Fragment Lacking the C-Terminal Phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 24599–24610.
- (41) Murza, A.; Belleville, K.; Longpré, J.-M.; Sarret, P.; Marsault, E. Stability and Degradation Patterns of Chemically Modified Analogs of Apelin-13 in Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Biopolymers* **2014**, 102, 297–303.
- (42) Zhang, Y.; Maitra, R.; Harris, D. L.; Dhungana, S.; Snyder, R.; Runyon, S. P. Identifying Structural Determinants of Potency for Analogs of Apelin-13: Integration of C-Terminal Truncation with Structure-Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**.
- (43) Wang, W.; McKinnie, S. M. K.; Patel, V. B.; Haddad, G.; Wang, Z.; Zhabyeyev, P.; Das, S. K.; Basu, R.; McLean, B.; Kandalam, V.; et al. Loss of Apelin Exacerbates Myocardial Infarction Adverse Remodeling and Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutic Potential of Synthetic Apelin Analogues. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, 2, e000249.
- (44) Murza, A.; Parent, A.; Besserer-Offroy, E.; Tremblay, H.; Karadereye, F.; Beaudet, N.; Leduc, R.; Sarret, P.; Marsault, É. Elucidation of the Structure-Activity Relationships of Apelin: Influence of Unnatural Amino Acids on Binding, Signaling, and Plasma Stability. *ChemMedChem* **2012**, 7, 318–325.

- (45) Vogt, W. Oxidation of Methionyl Residues in Proteins: Tools, Targets, and Reversal. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 93–105.
- (46) Black, J. W.; Leff, P. Operational Models of Pharmacological Agonism. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1983**, *220*, 141–162.
- (47) Limbird, L. E. *Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods*; Springer.; 2005; p. 23.
- (48) Galés, C.; Van Durm, J. J. J.; Schaak, S.; Pontier, S.; Percherancier, Y.; Audet, M.; Paris, H.; Bouvier, M. Probing the Activation-Promoted Structural Rearrangements in Preassembled Receptor-G Protein Complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 778–786.
- (49) Buck, J.; Sinclair, M. L.; Schapal, L.; Cann, M. J.; Levin, L. R. Cytosolic Adenylyl Cyclase Defines a Unique Signaling Molecule in Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 79–84.
- (50) Sunahara, R. K.; Taussig, R. Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Mol. Interv.* **2002**, *2*, 168–184.
- (51) Birnbaumer, L. Expansion of Signal Transduction by G Proteins. The Second 15 Years or so: From 3 to 16 Alpha Subunits plus Betagamma Dimers. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 772–793.
- (52) Ehrlich, A. T.; Furuyashiki, T.; Kitaoka, S.; Kakizuka, A.; Narumiya, S. Prostaglandin E Receptor EP1 Forms a Complex with Dopamine D1 Receptor and Directs D1-Induced cAMP Production to Adenylyl Cyclase 7 through Mobilizing G($\beta\gamma$) Subunits in Human Embryonic Kidney 293T Cells. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84*, 476–486.
- (53) Marques, F. D.; Ferreira, A. J.; Sinisterra, R. D. M.; Jacoby, B. A.; Sousa, F. B.; Caliari, M. V.; Silva, G. A. B.; Melo, M. B.; Nadu, A. P.; Souza, L. E.; et al. An Oral

Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. *Hypertension* **2011**, 57, 477–483.

- (54) Tatemoto, K.; Takayama, K.; Zou, M. X.; Kumaki, I.; Zhang, W.; Kumano, K.; Fujimiya, M. The Novel Peptide Apelin Lowers Blood Pressure via a Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *Regul. Pept.* **2001**, 99, 87–92.
- (55) Ehrhardt, C.; Schmolke, M.; Matzke, A.; Knoblauch, A.; Will, C.; Wixler, V.; Ludwig, S. Polyethylenimine, a Cost-Effective Transfection Reagent. *Signal Transduct.* **2006**, 6, 179–184.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES & DISCUSSION

1. Étude D-scan de l'apéline-13

Les connaissances en termes de relations structure-activité et les rôles de chaque acide aminé composant l'apéline-13 étaient très floues au moment où ce projet a débuté. En effet, depuis sa découverte en 1998, seuls quelques groupes se sont penchés sur des études visant à mieux comprendre les interactions de l'apéline-13 avec son récepteur. Par la synthèse de nouveaux analogues apélinergiques, l'un des principaux objectifs de notre projet a été de mieux délimiter la SAR. L'Ala scan du groupe de Medhurst a permis d'identifier les acides aminés de l'apéline-13 dont les remplacements par un résidu Ala sont délétères pour la liaison et pour les voies de signalisation AMPc et Ca^{2+} (Medhurst et al., 2003). Cette étude fournit des informations quant à l'importance de la chaîne latérale de l'acide aminé pour l'interaction du peptide avec le récepteur. Chaque acide aminé possède des angles dièdres qui lui sont propres, par conséquent la substitution par un résidu Ala peut conduire à des changements de conformation du peptide pouvant être très négligeables ou très importants. Afin d'en savoir plus sur les conclusions tirées de l'Ala scan, nous avons réalisé un D-scan. Ce dernier consiste à remplacer à tour de rôle les acides aminés de l'apéline-13 par leurs isomères non naturels D et de les tester en radioliasion pour visualiser l'impact de ces modifications sur la liaison au récepteur APJ. Les substitutions des résidus Pro¹², Met¹¹ et Pyr¹ par leurs D-isomères ont conduit à de légères pertes d'affinités par rapport à la Pyr¹-apéline-13 (inférieures à un facteur 10). Ces résultats suggèrent dans un premier temps l'importance relative de la conformation induite par le résidu Pro¹² sur la portion C-terminale. Ce résultat peut paraître intrigant étant donné qu'au sein des ligands peptidiques, les acides aminés Pro sont souvent considérés comme structurants et dont le remplacement est hautement néfaste à la conservation d'une bonne interaction avec le récepteur. En effet, la proline est cyclique et possède une amine secondaire imposant ainsi des angles dièdres Φ et Ψ contraints. Les caractéristiques spéciales du résidu Pro en font un inducteur de tournant de chaîne souvent impliquée dans les β -turn (Balbach and Schmid, 2000). En revanche, les légères pertes observées pour les remplacements des résidus Met¹¹

et Pyr¹ appuient les rôles limités de ces résidus pour l'affinité en accord avec l'Ala scan. L'inversion de la configuration des résidus Leu⁵ et Phe¹³ conduits à des pertes d'affinités modérées par rapport au ligand naturel d'un facteur 10 et 50 respectivement (IC₅₀ 61 et 109 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Notre étude souligne l'importance du résidu Phe¹³, en revanche la mutation du résidu Leu⁵ en Ala avait occasionné une plus importante baisse d'affinité. Cela suggère que la flexibilité de la chaîne latérale isobutyle du résidu Leu pourrait lui permettre un remplacement adéquat dans la pochette de liaison hydrophobe d'APJ qui serait en fait plutôt large. Les substitutions des acides aminés centraux Ser⁶, His⁷, Lys⁸ occasionnent des pertes d'un facteur 50 à 100 (IC₅₀ 642, 305 et 452 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Ces résultats, qui divergent avec ceux de l'Ala scan, nous amènent à penser que malgré le fait que les chaînes latérales des résidus Ser⁶, His⁷, Lys⁸ n'interagiraient pas directement avec APJ, l'inversion de leurs configurations pourrait changer la conformation globale du peptide et induire une perte d'affinité importante. Cette hypothèse est notamment soutenue par le modèle à deux épitopes décrit par le groupe de Llorens-Cortes (Iturrioz et al., 2010b). A l'inverse du résidu Pro¹², le changement de configuration des résidus Pro¹⁰ et Pro³ mène à d'énormes pertes d'affinités supérieures à un facteur 100 par rapport au ligand parent, notamment pour le résidu Pro³ (IC₅₀ 1639 et 3944 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Ce dernier est au cœur de l'épitope N-terminal de l'apéline-13, Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵, crucial pour la liaison au récepteur APJ. Ce fragment étant très structuré et rigide (Langelaan et al., 2009), il semble évident que sa substitution par son D-isomère bouleverse la conformation de cet épitope et entraîne une perte de liaison au récepteur. Enfin, en accord avec l'Ala scan, les analogues D-Arg⁴ et D-Arg² conduisent à d'importantes baisses d'affinités. D'après les études de RMN du groupe de Langelaan, les fonctions guanidines des deux résidus Arg feraient des interactions électrostatiques avec les résidus Asp²⁰ et Glu²³ du récepteur (Langelaan et al., 2013). Ces interactions semblent essentielles à la liaison du ligand au récepteur. De plus, notre étude D-scan tend à suggérer que contrairement à l'analogue D-Leu⁵ qui a pu partiellement se replacer dans sa pochette de liaison, l'inversion de configuration des résidus Arg² et Arg⁴ ne permet pas un tel réarrangement, alimentant ainsi l'hypothèse du groupe de Langelaan stipulant que la distance entre les deux fonctions guanidines serait faible (< 10 Å).

2. Étude du résidu C-terminal de l'apéline-13

L'acide aminé en C-terminal de l'apéline-13, le résidu Phe¹³, joue un rôle central dans l'internalisation d'APJ et les effets hypotenseurs *in vivo* chez le rat (Lee et al., 2005; Iturrioz et al., 2010a). L'équipe d'Iturrioz a suggéré en 2010 suite à une étude de modélisation moléculaire que cet acide aminé interagirait avec trois résidus aromatiques (Trp¹⁵², Phe²⁵⁵, Trp²⁵⁹) du récepteur APJ (Iturrioz et al., 2010a). Cette position n'a toutefois pas été investiguée plus avant d'un point de vue structural. Nous nous sommes donc intéressés à approfondir nos connaissances de la SAR à cette position par la synthèse d'analogues de l'apéline-13 modifiés en C-terminal par une sélection d'acides aminés non naturels aromatiques, puis en étudiant leurs capacités à lier le récepteur APJ, à inhiber la formation d'AMPc, et à provoquer le recrutement de la β -arrestine2. Les analogues modifiés qui vont suivre au cours de ce manuscrit ont été associés systématiquement au remplacement de la Met¹¹ par une norleucine (Nle). En effet, l'acide aminé Nle possède un atome de carbone à la place du soufre pour la Met offrant ainsi une plus importante stabilité chimique des peptides puisque le soufre a facilement tendance à s'oxyder (Vogt, 1995). Il faut également noter que l'analogue Met11Nle possède une affinité comparable au ligand naturel (IC₅₀ 2.6 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). La substitution du résidu Phe¹³ par les résidus diphenylalanine (Dip) et biphenylalanine (Bip), présentant des capacités accrues d'interactions π - π et étant singulièrement différents d'un point de vue structural, a permis de sonder la poche de liaison du récepteur. Une différence d'affinité d'un facteur 10 en faveur du résidu Bip suggère dans un premier temps que la pochette de liaison serait plus en longueur qu'en largeur (IC₅₀ 88 et 7.8 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Cela semble appuyer l'hypothèse d'une forte présence de résidus aromatiques sur le récepteur localisé autour de la portion C-terminale du ligand. Cependant, il fut surprenant d'observer que l'analogue modifié par une cyclohexylalanine (Cha), qui a pour chaîne latérale un cycle à 6 comme le résidu Phe mais sans électrons π , possède une affinité similaire au ligand naturel (IC₅₀ 2.3 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Bien que les conclusions tirées de la modélisation du groupe d'Iturrioz restent plausibles, ce résultat met en exergue que les interactions π - π ne seraient à l'évidence pas indispensables et que les interactions hydrophobes seraient suffisantes au maintien de l'affinité. La faible différence d'affinité lors de la substitution Phe13Trp suggère qu'un résidu pouvant donner une liaison hydrogène et ayant une densité

électronique accrue ne semble pas avoir d'impact significatif (IC_{50} 8.5 nM vs apéline-13 IC_{50} 5.7 nM). A l'inverse, l'introduction d'acides aminés électroniquement plus pauvres tels que (4-bromo)Phe, (2,4,5-trifluoro)Phe et (4-nitro)Phe améliore l'affinité par rapport à l'apéline-13 (IC_{50} 1.2, 0.83 et 2.6 nM vs apéline-13 IC_{50} 5.7 nM). Sans être un pré-requis, les interactions, avec les fragments riches en électrons qui seraient présents dans la poche C-terminale du récepteur, apparaissent favorisées en présence de résidus électroniquement pauvres sur le ligand. Sur la voie AMPc, les analogues de la Phe¹³ décrits plus haut présentent des profils agonistes avec des puissances (EC_{50}) proches du composé parent Met11Nle. Les puissances de ces composés à recruter la β -arrestine2 suivent les essais de radioliation. En effet, les analogues pauvres en électrons se sont révélés plus puissants sur la voie β -arrestine2 que l'apéline-13 (**voir tableau 2, article 1**).

Plus récemment, nous avons réalisé une seconde étude visant à explorer plus avant la position C-terminale de l'apéline-13. En effet, nous avons synthétisé et étudié en liaison et sur plusieurs voies de signalisation de nouveaux analogues dont le résidu Phe¹³ a été substitué. L'introduction de groupements électro-donneurs sur le cycle aromatique tels que les résidus Tyr(OMe) et Phe(4-Me) ont mené à une légère amélioration de l'affinité pour le récepteur APJ (IC_{50} 0.6 et 0.25 nM vs apéline-13 IC_{50} 1.2 nM), contrastant ainsi avec l'hypothèse d'une poche C-terminale du récepteur possédant des résidus aromatiques riches en électrons. Nous avons introduit à la place du résidu Phe¹³ de l'apéline-13 des acides aminés présentant des chaînes latérales de différentes tailles et une proximité par rapport au carbone α variable. L'analogue Phe13Phg par exemple, dont le cycle aromatique est directement lié au squelette peptidique, a mené à une perte d'affinité d'un facteur 10 (IC_{50} 14.3 nM vs apéline-13 IC_{50} 1.2 nM), cela souligne l'importance d'une distance entre la chaîne latérale de l'acide aminé en C-terminal de l'apéline-13 et le carbone α pour le maintien d'une affinité équivalente au peptide parent. La modification du résidu Phe¹³ par le résidu Tyr(OBn) provoque une amélioration conséquente (> 60 fois) de la liaison avec le récepteur APJ. Ce composé dont l' IC_{50} est de 20 pM est l'analogue le plus puissant rapporté dans la littérature en terme d'affinité, il s'agit donc d'un outil très intéressant pour étudier le système apélinergique dans un contexte physiologique. La poche C-terminale du récepteur semblerait être plutôt large et favorable à une augmentation du caractère π sur le ligand.

Cependant, l'introduction d'un résidu dihydroAnthranylAla, acide aminé dont la chaîne latérale est très encombrée, a conduit à une perte de liaison d'un facteur 10 environ suggérant qu'il y a une limite à l'augmentation de la taille et du caractère π du résidu C-terminal du ligand (IC_{50} 13.7 nM vs apéline-13 IC_{50} 1.2 nM). Des acides aminés di-substitués sur le carbone α à la place du résidu Phe¹³ ont également été synthétisés et testés. En effet, les analogues (L- α -Me)Phe¹³ et (D- α -Me)Phe¹³ ont mené à des affinités voisines du ligand naturel (IC_{50} 0.43 et 0.86 nM vs apéline-13 IC_{50} 1.2 nM). Cette nouvelle série de composés a été évaluée pour leurs capacités à inhiber l'accumulation d'AMPc et l'activation de la protéine $G\alpha_{i1}$ (**voir tableau 2, article 3**). Bien qu'à première vue, ces deux voies de signalisation pourraient sembler lier, plusieurs analogues se sont distingués pour leurs étonnantes disparités. Les modifications Phe13(L- α -Me)Phe et Phe13Bpa améliorent l'activation de la voie AMPc d'un facteur 30 environ, atteignant ainsi un EC_{50} de l'ordre de 60 pM. A nouveau, ces composés sont les plus puissants décrits sur cette voie et représentent, au même titre que l'analogue Tyr(OBn), de formidables outils pharmacologiques. Ces résultats restent toutefois surprenant étant donné leurs valeurs d'affinités pour le récepteur APJ presque 10 fois supérieures. Une explication plausible à ce phénomène s'appuie sur le modèle de Black et Leff (Black and Leff, 1983) ainsi que sur la théorie de l'occupation d'un GPCR ("*occupancy theory*"). Cette dernière stipule que certains analogues pourraient positionner le GPCR dans une conformation telle que le pourcentage de réponse biologique serait supérieur au pourcentage d'occupation du récepteur. Cette intrigante observation expérimentale, qui n'est pas sans précédent dans la littérature, reste à ce jour difficile à expliquer. De plus, les analogues (L- α -Me)Phe¹³ et Bpa¹³ engagent la protéine $G\alpha_{i1}$ avec des puissances 10 à 25 fois inférieures à celles de la voie AMPc ($G\alpha_{i1}$ EC_{50} 2.7 et 0.91 nM vs. cAMP EC_{50} 0.07 et 0.04 nM). En effet, d'autres sous-unités telles que $G\alpha_{i2,3}$, ou $G\alpha_o$ et également les sous-unités $G\beta\gamma$ peuvent conduire à une diminution des niveaux intracellulaire d'AMPc (Birnbaumer, 2007; Ehrlich et al., 2013). Enfin, l'analogue dont le résidu Phe¹³ est substitué par le résidu dihydroAnthranylAla entraîne une perte importante supérieure à un facteur 100 sur la voie AMPc suggérant que la poche C-terminale du récepteur APJ peut avoir un rôle dans l'inhibition de l'accumulation d'AMPc (EC_{50} 95 nM vs apéline-13 EC_{50} 1.4 nM).

Cette nouvelle investigation de la position C-terminale de l'apéline-13 nous a permis de découvrir trois puissants composés en termes d'affinités et d'activation de la voie AMPc. De plus, ces derniers présentent une meilleure résistance à la dégradation protéolytique. Il est évident qu'une étude plus poussée en modélisation moléculaire afin de comprendre la SAR de la poche C-terminale du récepteur APJ fait partie des nombreuses perspectives du projet apéline. Pour le moment, il est difficile de rationaliser ces résultats mais il semble tout de même clairement apparaître qu'il est possible de finement moduler l'affinité pour le récepteur et les deux voies de signalisation étudiées en modifiant le résidu C-terminal du ligand. Ces nouveaux composés représentent de très puissants outils pharmacologiques pour sonder les rôles physiologiques dans lesquels le système apélinergique serait impliqué et surtout les liens entre les voies de signalisation et les effets biologiques.

Dans cette optique, nous avons approfondi notre étude en se concentrant sur l'analogue de très haute affinité Tyr(OBn)¹³. Nous avons examiné l'engagement des protéines G α_{oA} , β -arrestine1 et β -arrestine2 induit par ce composé et l'apéline-13. De façon intéressante, le composé dont le résidu Phe¹³ est substitué par un résidu Tyr(OBn) active la sous-unité G α_{i1} et le recrutement de β -arrestine2 de manière équivalente au ligand naturel, en revanche il inhibe la formation d'AMPc, l'engagement de la sous-unité G α_{oA} et le recrutement de β -arrestine1 avec des puissances significativement plus importantes par rapport à l'apéline-13 (**voir figure 2A, article 3**). Nous avons également observé l'impact de la modification chimique sur la diminution de pression sanguine chez les rats Sprague-Dawley après administration intracaudale. En effet, il a été rapporté que l'acide aminé C-terminal du peptide est crucial pour le maintien des effets hypotenseurs induits par l'apéline-13 (Lee et al., 2005). L'analyse des courbes dose-réponse a révélé que l'analogue Tyr(OBn)¹³ provoque une plus importante diminution de la pression sanguine que l'apéline-13. L'étude des aires sous la courbe a démontré que l'effet hypotenseur provoqué par le composé Tyr(OBn)¹³ est significativement plus soutenu comparé à l'apéline-13 aux doses 0.1 et 1 mg/kg. Nous avons observé, lors de nos essais de stabilité plasmatique, que l'analogue Tyr(OBn)¹³ possède une demi-vie bien supérieure au peptide parent (66 min vs. 14 min) (Murza et al, 2014). Cet effet hypotenseur sensiblement plus soutenu pourrait être lié à cette amélioration de la stabilité plasmatique. De plus, ces résultats confortent les travaux

réalisés par Ceraudo et ses collaborateurs suggérant que les effets hypotenseurs du système apélinergique seraient associés aux recrutements des β -arrestines (Ceraudo et al., 2014).

3. *Étude des analogues 1Nal¹³ et 2Nal¹³ de l'apéline-13*

Nous nous sommes également intéressés de plus près à deux autres analogues modifiés en C-terminal possédant des structures chimiques voisines: le 1Nal¹³ et le 2Nal¹³. Ces derniers ont été testés *in vivo* chez le rat mâle Sprague-Dawley sur le modèle de douleur tonique "formaline". Cet essai consiste en l'administration de formaline (provoquant une douleur aiguë puis inflammatoire) dans une patte de l'animal cinq minutes après l'administration par voie intrathécale du ligand à étudier (ou de la saline). Durant une heure, l'expérimentateur observe les comportements de l'animal et attribue des scores de douleur (Roussy et al, 2009). L'animal va passer par trois stades comportementaux au cours de la période d'observation d'1 heure: une phase aiguë (0-9 min) correspondant à l'activation des nocicepteurs périphériques, une interphase (9-20 min) impliquant le recrutement des mécanismes descendants inhibiteurs de la douleur et conduisant à une diminution nette des comportements douloureux et enfin une phase inflammatoire (20-60 min) engendrée par une sensibilisation centrale. Il apparaît que l'apéline-13 ainsi que l'analogue 1Nal¹³ n'occasionnent aucuns effets analgésiques par rapport aux rats contrôles. En revanche, l'analogue 2Nal¹³ provoque un effet analgésique significatif en phase inflammatoire (**Figure 23**). Cette importante différence d'effet physiologique est très surprenante compte tenu de la faible différence structurale séparant 1Nal et 2Nal. Une étude signalétique approfondie a été menée sur la voie AMPc, sur le recrutement des β -arrestines1/2, et enfin sur l'activation des protéines $G\alpha_{i/o}$ à l'aide de biosenseurs et de la technique de BRET². En comparant les analogues 1Nal¹³ et 2Nal¹³, nous avons observé des biais significatifs entre les voies β -arrestines1/2 par rapport à la voie AMPc (**Tableau 3**). En effet, le composé 2Nal¹³ active les voies β -arrestines1/2 à des puissances environ 10 à 100 fois supérieures à celle du 1Nal¹³ (en rouge) tout en conservant des puissances équivalentes pour l'inhibition de la formation d'AMPc (en vert). Dans le but d'identifier les résidus du récepteur impliqués dans cette sélectivité fonctionnelle, nous avons débuté une étude de modélisation moléculaire du récepteur APJ par homologie avec le récepteur AT1, ce dernier possédant une forte homologie de 54% dans les domaines transmembranaires

(O'Dowd et al., 1993) lui même obtenu par homologie avec CXCR4. L'arrimage des analogues 1Nal¹³ et 2Nal¹³ et une observation attentive des différentes conformations adoptées par leurs chaînes latérales ont révélé que le groupement naphthalène du 1Nal¹³ semble beaucoup plus contraint et dirigé vers une zone précise du TMD6, alors que la chaîne latérale du 2Nal¹³ semble avoir plus de degrés de liberté (**Figure 24**).

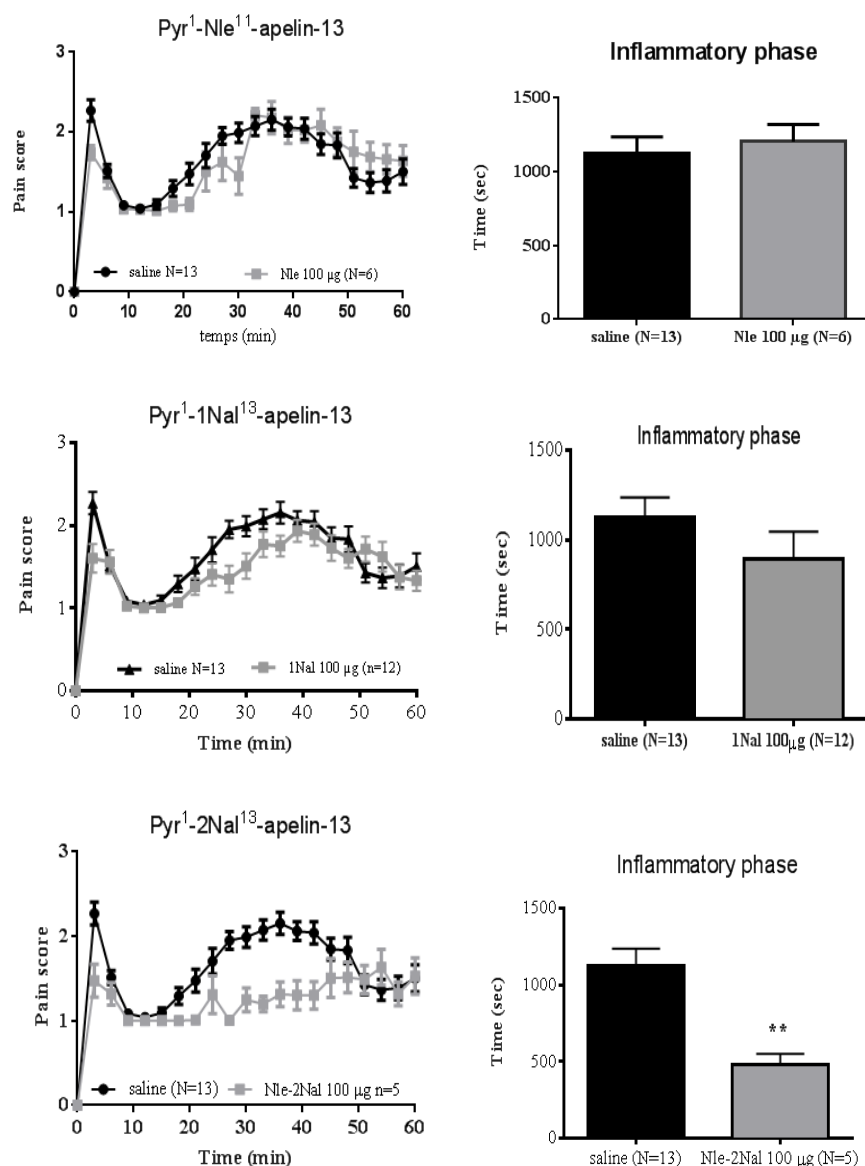


Figure 23. Test à la formaline chez le rat mâle Sprague-Dawley de l'apéline-13 et des analogues 1Nal et 2Nal. En phase inflammatoire, l'analogue 2Nal¹³ engendre un effet analgésique significatif par rapport aux rats saline, contrairement au 1Nal¹³ et au composé parent. Analyses statistiques réalisées avec un test de Mann-Whitney. ** p < 0.01 vs. apelin-13

EC ₅₀ (nM)	Binding	AMPC	β-arr1	β-arr2	Gα _i	Gα _o
Apéline-13	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.4	107 ± 34	93 ± 27	2.6 ± 0.7	3.9 ± 0.9
1Nal	14 ± 1.7	28 ± 4	218 ± 146	522 ± 190	24 ± 9	4.5 ± 1.1
2Nal	1.2 ± 0.2	20 ± 10	3.5 ± 2.1	70 ± 20	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1

Tableau 3. Essais de radioliation et sur différentes voies de signalisation de l'apéline-13 et des analogues 1Nal et 2Nal. Il y a un biais sur le recrutement des β-arrestines1/2 par rapport à la voie AMPc entre le 1Nal et le 2Nal.

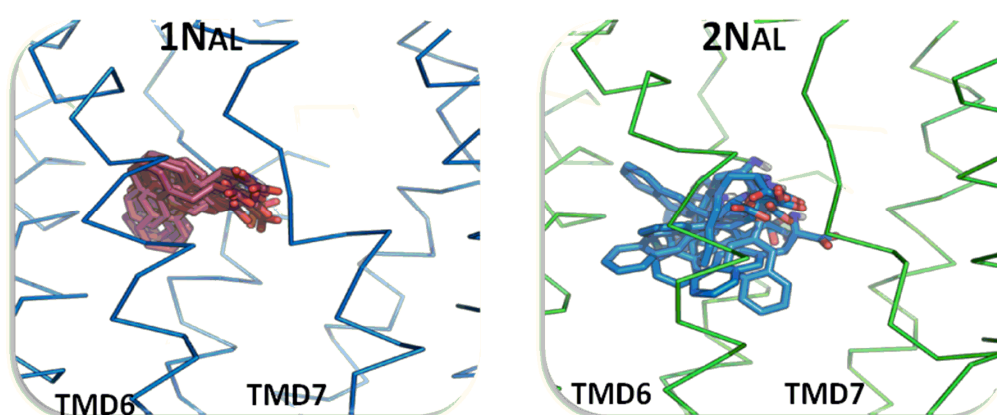


Figure 24. Modélisation moléculaire des chaînes latérales des analogues 1Nal et 2Nal dans la pochette de liaison du récepteur APJ. Le modèle moléculaire du récepteur APJ a été construit par homologie avec le récepteur CXCR4 en utilisant le logiciel *GROMACS* et le champ de force *Gromos 53A6*. Les analogues 1Nal et 2Nal sont arrimés à APJ et ces structures représentent 10 simulations de 40 ns chaque. Seuls les résidus 1Nal et 2Nal des analogues sont représentés pour plus de clarté.

Ces résultats préliminaires sont encourageants et mettent en évidence une possible différence d'activation du récepteur que nous pourrions relier à la sélectivité fonctionnelle observée. Une analyse à l'échelle moléculaire de ces modèles pourrait nous permettre d'identifier des résidus du récepteur APJ, vraisemblablement des acides aminés de type aromatique, qui seraient à distance d'interaction de la chaîne latérale du résidu 2Nal et pas de celle du résidu 1Nal. Dans cette optique, des études de mutagenèse dirigée de ces résidus pourraient supporter nos hypothèses. Les perspectives de ce volet multidisciplinaire du projet apéline représentent une avenue très prometteuse dans notre quête de la découverte du lien unissant structures, voies de signalisation et effets physiologiques.

4. Étude du résidu Pro¹² de l'apéline-13

Un bon candidat clinique pour une cible pharmacologique donnée se doit de présenter des propriétés pharmacodynamiques intéressantes, mais il est aussi capital que son profil pharmacocinétique soit le plus optimal possible. Dans ce projet, nous avons également porté un intérêt particulier à la stabilité plasmatique des nouveaux analogues synthétisés. Dans la littérature, les données à ce sujet sont très rares. En effet, il a été mis en évidence par le groupe de Vickers en 2002 que l'apéline-13 est un substrat de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE-2) hydrolysant ainsi l'hormone entre les résidus Pro¹² et Phe¹³ (Vickers et al., 2002). Suite à notre étude du résidu Phe¹³, nous nous sommes intéressés aux remplacements du résidu Pro¹² par une sélection d'acides aminés non naturels possédant des environnements stériques variables afin d'améliorer la stabilité plasmatique et mieux comprendre la SAR liée à cette position. Le remplacement du résidu Pro¹² par l'aminointhane et la tert-leucine (Tle) provoque une légère perte d'affinité possiblement causée par un changement conformationnel local (IC₅₀ 20 et 16 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). La substitution par l'acide isonipecotique (Inp), qui est un acide gamma-aminé, n'a pas affecté l'affinité (IC₅₀ 5.0 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). Soulignons que l'introduction de l'acide isobutyrique (Aib) à la place de la Pro¹² a mené à un analogue possédant une affinité sub-nanomolaire (IC₅₀ 0.76 nM vs apéline-13 IC₅₀ 5.7 nM). En accord avec les conclusions tirées du D-scan, l'absence d'impact significatif sur la liaison au récepteur APJ pour cette série met davantage en exergue que cette position n'aurait pas un rôle critique dans le positionnement de la portion C-terminale du ligand. Sur le plan signalétique, les modifications du résidu Pro¹² ont conduit à des puissances plutôt homogènes sur la voie AMPc et le recrutement de la β -arrestine2 avec des profils agonistes dont la différence par rapport au ligand naturel est inférieure à un facteur 10. Seul se distingue le composé Pro12aminointhane qui semble être un agoniste partiel sur la voie AMPc, et dont l'EC₅₀ sur β -arrestine2 est de l'ordre du micromolaire soit une perte supérieure à un facteur 10 vis-à-vis de l'apéline-13 (EC₅₀ 1204 nM vs apéline-13 EC₅₀ 91 nM).

5. *Étude de la stabilité plasmatique et du profil de dégradation de l'apéline-13 et de ses analogues*

Nous avons évalué l'impact des modifications chimiques sur la stabilité plasmatique *in vitro* dans du plasma de rat. En règle générale, nous avons observé une amélioration pour les analogues modifiés en C-terminal, en référence à l'apéline-13, particulièrement pour ceux présentant une augmentation de l'environnement stérique. En revanche, il fut surprenant de constater que les substitutions du résidu Pro¹² n'ont pas mené à cette même tendance. Bien que certains analogues de cette série affichent une résistance accrue à la dégradation protéolytique, d'autres apparaissent plus rapidement dégradés. Plus encore, en installant des acides aminés non naturels autour du site privilégié de clivage (d'après la littérature), nous nous attendions à une augmentation bien plus importante de la stabilité plasmatique de nos ligands. Les profils de dégradation dans le plasma n'ayant encore pas été élucidés, ce fut une évidence pour nous de débiter une telle étude par l'utilisation de la chromatographie en phase liquide haute-performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). En effet, cela permettrait de pouvoir mieux cibler les régions sensibles de l'apéline-13 où installer des modifications chimiques afin d'améliorer davantage la stabilité protéolytique de nos futurs analogues.

Nous avons donc incubé l'apéline-13 dans différents types de plasma (rat, souris, humain) et dans du liquide céphalo-rachidien (LCR) de rat à des temps allant de 30 minutes à 2 heures. Un premier clivage est observé entre les résidus Leu⁵ et Ser⁶, puis le fragment C-terminal Ser⁶→Phe¹³ ainsi formé subit un clivage de seconde génération menant à la suppression du résidu Ser⁶ probablement par une amino-exopeptidase. Ce profil de dégradation est apparu comme identique dans les différents types de plasma et dans le LCR de rat. A noter que dans ce dernier, l'apéline-13 est sensiblement moins vite hydrolysée ce qui n'est pas étonnant compte tenu des plus faibles quantités de protéases présentes dans le LCR par rapport au plasma (Biringer et al., 2006). A première vue, il peut sembler surprenant de ne pas retrouver le clivage décrit dans la littérature entre la Pro¹² et la Phe¹³ par l'ACE-2 (Vickers et al., 2002). Cependant l'ACE2, étant une enzyme membranaire exprimée de façon prédominante dans les cellules endothéliales, est par conséquent absente dans le plasma isolé (Guy et al., 2005). Le clivage Leu⁵-Ser⁶ est localisé dans une région très structurée de l'apéline-13 d'après les travaux de résonance magnétique nucléaire du

groupe de Langelaan (Langelaan et al., 2009). De plus, des études de modélisation moléculaires ont suggéré que la fonction hydroxyle de la chaîne latérale de la Ser⁶ ferait une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la Leu⁵ stabilisant ainsi un β -turn de type I au sein du fragment Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶-His⁷ (Macaluso and Glen, 2010). Il semble donc raisonnable d'émettre une hypothèse quant au rôle important de cette potentielle structure secondaire pour la reconnaissance du site de clivage par la ou les protéases responsables de l'hydrolyse du lien Leu⁵-Ser⁶. Afin d'explorer plus avant l'impact de modifications chimiques autour de ce site de clivage inédit de l'apéline-13, nous avons synthétisé des analogues dont les résidus Leu⁵ et Ser⁶ sont remplacés par des acides aminés naturels et non-naturels. Dans un premier temps, nous avons introduit de la diversité chimique à la place du résidu Leu⁵. En effet, cet acide aminé étant capital pour la liaison à APJ, nous en avons profité pour étudier à la fois les effets des modifications sur la dégradation protéolytique et sur l'affinité. Les substitutions Leu5Phe et Leu5Cha ont conduit à des pertes d'affinités inférieures à un facteur 10 suggérant que la présence d'un groupement aromatique ne serait pas délétère pour la liaison au récepteur. En revanche, l'introduction de chaînes latérales chargées positivement et négativement a mené à une perte d'affinité d'un facteur 100 pour l'analogue Leu5Lys et un IC₅₀ > 10 μ M pour l'analogue Leu5Glu. La poche de liaison du résidu Leu⁵ semble donc être hautement lipophile dans laquelle l'introduction d'une simple charge aurait des conséquences néfastes pour la liaison à APJ. La stabilité plasmatique *in vitro* dans du plasma de rat ainsi que les demi-vies de ces nouveaux composés ont été évaluées dans un second temps. Dans nos essais, l'apéline-13 affiche une demi-vie ($t_{1/2}$) proche de 14 minutes. Parmi les analogues de la Leu⁵ synthétisés, seule l'introduction d'une charge négative (Leu5Glu) semble augmenter sensiblement la stabilité plasmatique du composé, doublant ainsi sa demi-vie par rapport à l'apéline-13. Les modifications ayant conduit aux plus importantes améliorations de la demi-vie plasmatique sont les substitutions des résidus Leu⁵ et Ser⁶ par leurs isomères D (respectivement $t_{1/2}$ = 52 min et 45 min) (Murza et al, 2014). Ces derniers résultats encourageants pour la validation de notre nouveau site de clivage de l'apéline-13 nous ont conduit à évaluer le profil de dégradation des analogues D-Leu⁵ et D-Ser⁶. La présence d'acides aminés D abroge complètement l'hydrolyse de la liaison Leu⁵-Ser⁶. Le premier clivage est ainsi déplacé entre les résidus His⁷ et Lys⁸ suivi par la suppression C-terminale

du résidu His⁷ du fragment Pyr¹→His⁷ formé. A la lumière des conclusions tirées de cette étude, la présence d'un site de clivage entre les résidus Leu⁵ et Ser⁶ au sein de l'apéline-13 lors d'une incubation dans les plasma humain, de rat et de souris est considérablement renforcée.

Lors de nos travaux sur des analogues substitués en C-terminal de l'apéline-13, nous avons observé l'importance de cette position sur l'affinité, la voie de signalisation AMPc et le recrutement de la β -arrestine2 (Murza et al., 2012). Également, il était apparu que ces modifications chimiques amélioreraient sensiblement, dans certains cas, la stabilité plasmatique des analogues. Dans le but de prolonger cette étude, nous avons synthétisé une nouvelle série d'analogues de l'apéline-13 dont le résidu Phe¹³ a été substitué par des acides aminés non naturels aromatiques possédant une grande variété d'environnements chimiques et stériques. Les analogues tyrosine-O-benzyl (Tyr(OBn)¹³), 4-benzoyl-phenylalanine (Bpa¹³), 4-méthyl-phenylalanine ((4-Me)Phe¹³) et L- α -méthyl-phenylalanine ((L- α -Me)Phe¹³) ont mené à des demi-vies plasmatiques atteignant l'heure dans nos essais (**voir tableau 1, article 2**). De façon impressionnante, la substitution (L- α -Me)Phe¹³ a amélioré grandement la stabilité du peptide, portant ainsi sa demi-vie à plus de deux heures par rapport à l'apéline-13 qui a une demi-vie de 14 minutes dans cet essai. A l'évidence, modifier l'acide aminé en C-terminal semble avoir de plus grandes répercussions sur la demi-vie plasmatique *in vitro* qu'une mutation des acides aminés Leu⁵ et Ser⁶. Cette observation s'avère d'autant plus surprenante puisque nos essais ont mis évidence qu'un clivage avait lieu entre les résidus Leu⁵ et Ser⁶ et non entre les résidus Pro¹² et Phe¹³. Nous avons voulu déterminer si la modification (L- α -Me)Phe menant à une importante augmentation de la stabilité plasmatique avait changé le profil de dégradation. Ce dernier reste identique à celui de l'apéline-13. L'enzyme responsable de l'hydrolyse de la liaison Leu⁵-Ser⁶ semble donc plus affectée par des modifications en position P₈' qu'en position P₁' ou P₁. Bien que peu fréquent, ce phénomène n'est pas sans précédent. En effet, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) clive la big ET-1(19-34) entre les résidus Trp²¹ et Val²². Les mutations successives en Ala de ces derniers résidus n'affectent que modérément la demi-vie plasmatique de ces analogues par rapport à la big ET-1 native. En revanche, la substitution par le résidu Ala d'un acide aminé situé en P₁₂' réduit énormément la

reconnaissance de l'analogue par l'ECE (Okada et al., 1993). Sans valider notre hypothèse, cet exemple renforce les conclusions tirées de cette étude. Une des prochaines étapes de ce volet du projet consisterait à découvrir l'enzyme responsable du clivage Leu⁵-Ser⁶. Par l'utilisation de plusieurs inhibiteurs à large spectre, nous avons débuté une étude préliminaire qui a fortement suggéré qu'une ou des métalloprotéases de type zinc seraient impliquées dans le clivage susmentionné (Murza et al, 2014).

Les profils de dégradation et le temps de demi-vie d'un composé s'avèrent généralement bien différents dans du plasma isolé comparés à ce que l'on peut observer chez un être vivant. Nous avons donc conduit une étude similaire à celle présentée plus haut en administrant, chez le rat mâle Sprague-Dawley anesthésié, les analogues apélinergiques d'intérêts par voie intraveineuse (i.v.) dans la veine caudale. À différents temps allant de 1 à 10 minutes, du sang a été prélevé dans la même veine, puis après arrêt des réactions enzymatiques par un mélange d'inhibiteurs, le plasma a été isolé puis analysé pour déterminer les sites de clivage. Dans les trois premières minutes, l'apéline-13 native a subi plusieurs clivages distincts. L'hydrolyse de la liaison Pro¹²-Phe¹³ par l'ACE2, absente lors de nos essais *in vitro*, s'avère présente *in vivo*. Cependant, il est important de mentionner que les signaux en HPLC-MS révèlent que le fragment Pyr¹→Pro¹² semble présent en quantité extrêmement faible. Un site de clivage inédit entre les résidus Pro¹⁰ et Met¹¹ a été observé suivi par l'hydrolyse de la liaison Ser⁶-His⁷ conduisant aux peptides Pyr¹→Ser⁶ et His⁷→Pro¹⁰. Le clivage entre les résidus Leu⁵ et Ser⁶, présent dans le plasma isolé, semble absent suite à l'administration i.v. chez le rat. En effet, les signaux correspondant aux fragments Pyr¹→Leu⁵ et Ser⁶→Phe¹³ ou Ser⁶→Pro¹² n'apparaissent pas lors des analyses. Il est toutefois envisageable que ces derniers, notamment le fragment Pyr¹→Leu⁵, soient très rapidement dégradés à leur tour empêchant ainsi leurs identifications. En d'autres termes, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que l'hydrolyse de la liaison Leu⁵-Ser⁶ présent *in vitro* et bel et bien absent *in vivo*. La demi-vie de l'apéline-13 chez le rat semble faible, entre 3 et 5 minutes, puisque qu'après 5 minutes nous ne retrouvons plus de traces ni du ligand parent, ni des résidus de clivages. L'analogue (L- α -Me)Phe¹³ ayant présenté la demi-vie plasmatique la plus importante a été également administré chez le rat. À l'exception du clivage Pro¹²-Phe¹³ qui n'apparaît plus, un profil de dégradation identique à l'apéline-13 a

été observé. La modification chimique de l'acide aminé en C-terminal semble avoir empêchée la reconnaissance par l'ACE2, en revanche il est surprenant que cet analogue présentant une telle amélioration de la stabilité plasmatique *in vitro* soit aussi rapidement dégradé que le peptide parent *in vivo*. Dans un organisme vivant, les enzymes sont beaucoup plus variées et nombreuses, nous pouvons donc imaginer que cette différence pourrait être le fruit d'une protéase absente du plasma isolé. Une très rapide excrétion rénale serait également à envisager. En l'état, il est difficile d'avoir plus de certitudes et bien que nous fûmes surpris de ne pas observer l'augmentation de la stabilité *in vivo* escomptée avec l'analogue (L- α -Me)Phe¹³, les analogues modifiés en C-terminal demeurent intéressants pour leurs potentiels à contrer la dégradation enzymatique opérée par l'ACE2.

6. Étude de la portion centrale de l'apéline-13

Comme nous l'avons vu jusqu'à présent, le projet apéline possède un fort aspect multi-disciplinaire. En effet, la mise au point de composés permettant de sonder les effets physiologiques qui nous intéressent est un des aspects importants de l'étude. Cela passe par un apprentissage et un approfondissement des connaissances de la SAR avec la cible. En tant que chimiste médicinal, j'ai également porté beaucoup d'intérêt à faire évoluer la structure de nos composés et à améliorer leur stabilité. L'apéline-13 et les analogues que nous avons évoqués sont des molécules de taille importante et distantes de la structure d'un potentiel candidat clinique. Afin de se rapprocher davantage d'une structure "drug-like", nous avons utilisé la somme des informations de SAR que nous avons pu tirer de nos études discutées plus haut. L'apéline-13 possède deux pharmacophores ou épitopes distants, le fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ est important pour l'interaction avec le récepteur alors que le résidu C-terminal joue un rôle clé dans le recrutement des β -arrestines, l'internalisation d'APJ et les effets hypotenseurs *in vivo*. Il est évident que cette configuration n'est pas la plus simple pour réduire la taille de la molécule et la faire évoluer vers un composé plus "drug-like". Nous avons donc synthétisé et testé en radiolisation des peptides dont les deux épitopes importants sont reliés par différentes sortes d'espaceurs. La portion centrale du peptide, Ser⁶-His⁷-Lys⁸-Gly⁹, a été remplacée par une chaîne flexible et hydrophile polyéthylène glycol (PEG) de deux tailles différentes, puis par un fragment plus rigide poly(alanine) inducteur d'hélices α (Wei et al., 2011). L'introduction d'un (PEG)₄ conduit à

une perte d'un facteur supérieur à 100 par rapport à l'apéline-13 (IC_{50} 450 nM vs apéline-13 IC_{50} 5.7 nM), tandis que le PEG plus long et le motif poly(alanine) mène à de très médiocres affinités (IC_{50} 13.7 et 3.7 μ M vs apéline-13 IC_{50} 5.7 nM). Nous avons également étudié un analogue tronqué dont les résidus centraux ont simplement été supprimés. Sans mener à une absence totale d'affinité, la perte reste tout de même conséquente (\approx facteur 1000 par rapport au ligand naturel) (IC_{50} 5.4 μ M vs apéline-13 IC_{50} 5.7 nM). Nous fûmes surpris de constater que le fragment Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵ n'est pas suffisant pour maintenir une bonne interaction avec le récepteur et les espaceurs utilisés ne semblent pas non plus être satisfaisants. En s'inspirant du composé E339-3D6 possédant un motif tri-cationique séparé par un long espaceur aliphatique d'un groupement poly-aromatique (Iturrioz et al., 2010b), nous avons introduit des groupements linéaires polyméthylène (enchaînement de motifs $(CH_2)_n$) allant de 5 à 10 unités. Ces différents analogues ont conduit à des affinités proches les uns des autres avec des IC_{50} compris entre 250 et 500 nM, soit une perte inférieure à un facteur 100 par rapport à l'apéline-13. Parmi nos tentatives, un espaceur flexible de type aliphatique semblerait être le meilleur candidat permettant de séparer les deux épitopes distants. Toutefois, nous n'avons pas évalué les capacités de ces composés à activer les voies de signalisations AMPc ou à induire l'internalisation du récepteur APJ. Il est d'ailleurs fort probable que le résidu Phe C-terminal, du fait de l'importante flexibilité de la chaîne centrale, n'ait pas pu correctement se placer dans sa poche de liaison afin d'interagir avec les résidus du récepteur responsables du recrutement des β -arrestines.

7. Approche macrocyclique: première série d'analogues macrocycliques de l'apéline-13 et résultats préliminaires

Nous avons porté un grand intérêt à une alternative intéressante pour conserver une distance entre les deux pharmacophores. L'intégration d'un macrocycle, dont la fermeture de cycle est non-naturelle (contrairement aux ponts amides ou disulfures) présente plusieurs avantages. En effet, sa structure confère une meilleure résistance à la dégradation protéolytique, et elle est plus contrainte que son homologue linéaire se traduisant au final par un meilleur profil thermodynamique et pharmacocinétique (pour plus de détails, voir introduction chap. 6). De plus, leurs contraintes conformationnelles font de ces molécules d'excellents outils pour sonder l'espace chimique d'un récepteur. La conception de

nouveaux analogues macrocycliques de l'apéline-13 s'est basée sur les connaissances de la SAR dans la littérature, et également sur nos propres résultats. Les deux épitopes Arg²-Pro³-Arg⁴-Leu⁵-Ser⁶ et l'acide aminé en C-terminal ont été les fondations de ces analogues. Le résidu Phe¹³ a été remplacé par Tyr(OBn), ce qui a mené à une importante amélioration de l'affinité sur les analogues linéaires (IC₅₀ 20 pM vs Apéline-13 IC₅₀ 1.2 nM). Les résidus His⁷ et Met¹¹ lorsque remplacées par une Ala n'entraînent aucune perte en liaison (Medhurst et al., 2003), nous avons substitué chacun des deux acides aminés par un résidu allylglycine dont la double liaison de la chaîne latérale va permettre de cycliser par la méthode de métathèse des oléfines également connue sous le nom de "Ring Closing Metathesis" (Patgiri et al., 2010). Plus précisément, cette méthode permet de coupler deux liaisons doubles en une seule à l'aide d'un catalyseur au ruthénium. Cette réaction est largement utilisée en synthèse organique et en synthèse peptidique (Pérez de Vega et al., 2011), car elle permet de cycliser les peptides en phase solide qui offre l'avantage d'un phénomène de pseudo-haute dilution permettant d'éviter la formation de dimères. Le résidu Pro¹², séparant le cycle du Tyr(OBn) C-terminal, a été dans un premier temps supprimé. Enfin, le résidu Pyr¹ a été retiré puisque d'après l'Ala scan, elle semble n'avoir aucune influence sur l'affinité pour APJ. La **figure 25** schématise la conception du premier analogue macrocyclique de l'apéline-13. Par la suite, nous avons déplacé le résidu Tyr(OBn) par rapport au cycle, intégré des acides aminés espaceurs à la place de Pro¹², modifié la constitution même du cycle et opéré des changements au sein du fragment peptidique N-terminal afin de le simplifier.

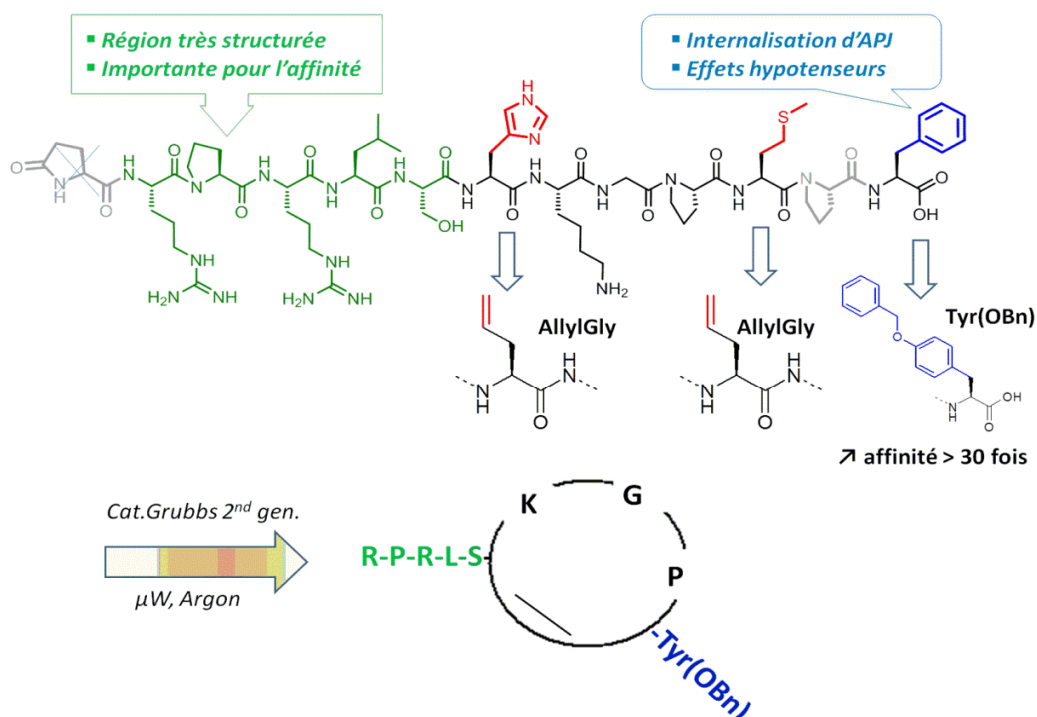


Figure 25. Conception du premier analogue macrocyclique de l'apéline-13. Les acides aminés N-terminaux (en vert) sont importants pour la liaison au récepteur. L'acide aminé C-terminal (en bleu) joue un rôle dans l'internalisation d'APJ et les effets hypotenseurs *in vivo*, il a été remplacé par le Tyr(OBn). L'His⁷ et la Met¹¹ (en rouge) ont été remplacées par des allylglycines afin de cycliser par métathèse des oléfines en présence du catalyseur de Hoveyda-Grubbs 2nd génération. La Pyr¹ est supprimée et la Pro¹² est dans un premier temps retirée.

Les différents analogues qui vont suivre ont été testés pour la plupart en radioliation et pour leur capacité à inhiber la formation d'AMPC et à recruter la β -arrestine2. Le macrocycle **AM02-24**, premier de la série, présente le Tyr(OBn) C-terminal de façon exocyclique. Il possède une affinité proche de l'apéline-13 avec une perte raisonnable inférieure à un facteur 10. En revanche, l'impact sur les voies de signalisation étudiées est bien plus important. Il apparaît une diminution nette de l'inhibition de la formation d'AMPC et du recrutement de la β -arrestine2 d'un facteur 30 environ (**Figure 26**). Nous avons modifié la position du résidu Tyr(OBn) par rapport au fragment N-terminal en l'intégrant au cycle et en le plaçant entre la Gly et la Pro (**AM02-33**), puis entre les résidus Lys et Gly (**AM02-37**), augmentant ainsi la taille du cycle le faisant ainsi passer de 17 à 20 atomes. Les conséquences pharmacodynamiques de ces modifications sont considérables. En effet,

nous observons une baisse d'affinité d'un facteur 10 (**AM02-33**) puis d'un facteur 200 (**AM02-37**). Bien que de nombreuses évidences dans la littérature suggèrent fortement que la portion N-terminale de l'apéline-13 serait cruciale pour l'interaction avec APJ, il semblerait qu'elle ne soit pas suffisante. C'est au niveau signalétique que c'est le plus délétère puisque le déplacement du Tyr(OBn) conduit à une absence d'activation des voies AMPc et β -arrestine2 (**Figure 26**).

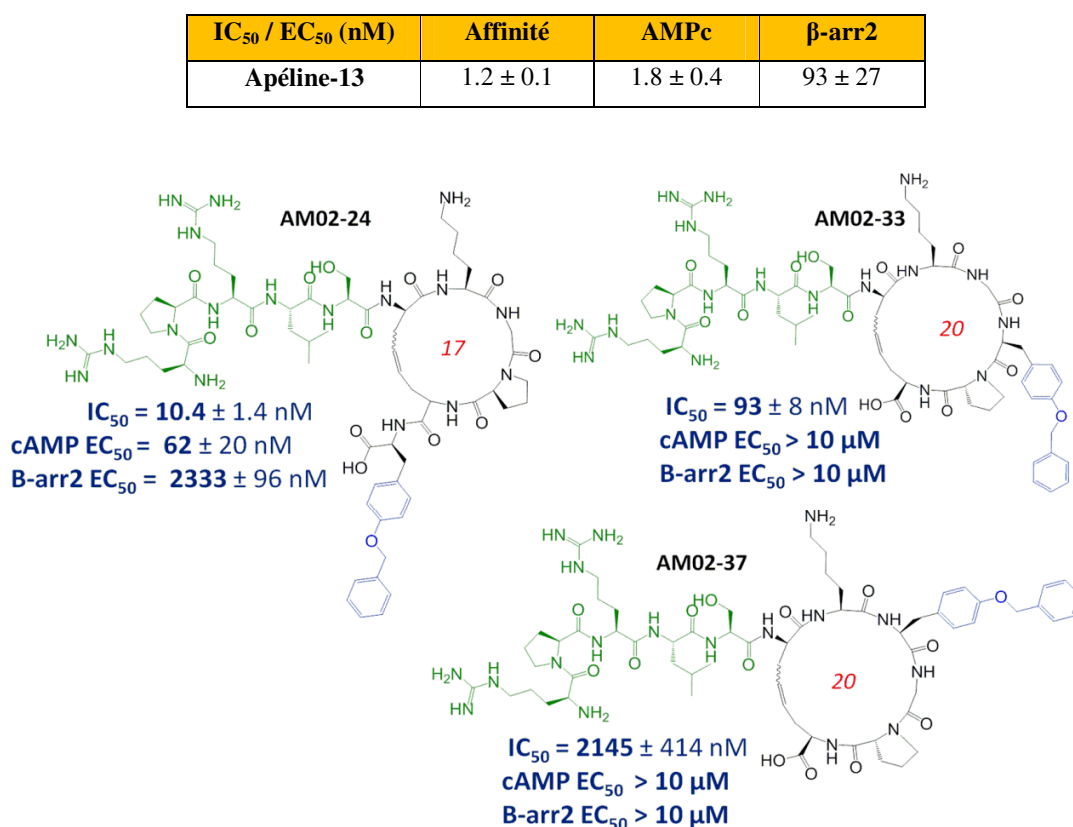


Figure 26. Effets du déplacement du Tyr(OBn) sur l'affinité et la signalisation. La portion N-terminale en vert est la même que celle de l'apéline-13. Le Tyr(OBn) est indiqué en bleu. Le chiffre en rouge indique la taille du cycle.

Le composé **AM02-24** dont le résidu Tyr(OBn) est exocyclique présente de loin les paramètres pharmacodynamiques les plus intéressants. La distance entre les deux épitopes et la conformation imposée par le macrocycle apparaît comme avantageuse du point de vue de l'affinité. Afin d'améliorer l'activation des voies de signalisation étudiées, nous avons introduit des acides aminés induisant des conformations variées en guise d'espaces entre le cycle et le Tyr(OBn) à savoir les résidus Pro (**AM02-36**), β -Ala (**AM02-46**) et Ala

(AM02-47) (Figure 27). L'éloignement du résidu Tyr(OBn) par rapport au cycle améliore légèrement l'affinité pour APJ, notamment dans le cas du composé AM02-46 dont l'espaceur est le plus flexible. Bien que la détermination des puissances sur la voie AMPc ne soit pas encore complète, il semble pour le composé AM02-36 que la différence par rapport à l'analogue macrocyclique parent (AM02-24) sans espaceur ne soit pas importante. En revanche, l'impact sur le recrutement de la β -arrestine2 est majeur. L'introduction d'un résidu Pro, induisant un coude, ou d'un résidu β -Ala, plus flexible, améliore la puissance des analogues par rapport à AM02-24 ($EC_{50} = 2333$ nM), étant ainsi voisine de l'apéline-13 ($EC_{50} = 93$ nM). La présence d'une Ala n'affecte que modérément l'affinité et le recrutement de la β -arrestine2 (Figure 27).

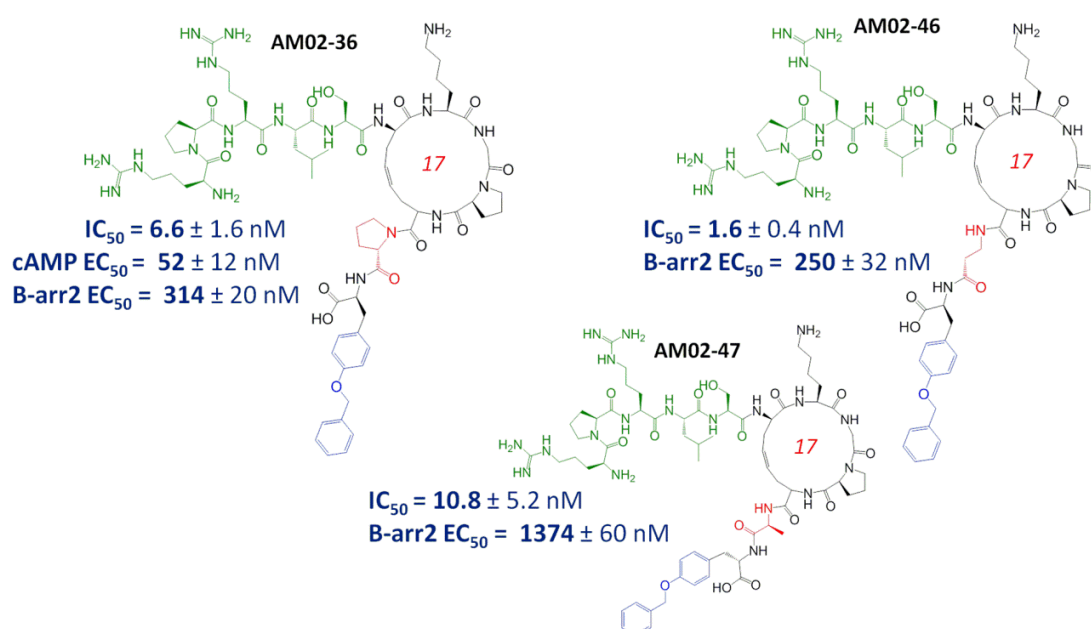


Figure 27. Effets sur l'affinité et la signalisation de l'insertion d'un acide aminé entre le Tyr(OBn) et le cycle. La portion N-terminale en vert est la même que celle de l'apéline-13. Le Tyr(OBn) est indiqué en bleu. L'acide aminé servant d'espaceur est en rouge. Le chiffre en rouge indique la taille du cycle.

L'analyse des résultats obtenus par ces trois analogues suggère que les résidus du récepteur responsables de l'engagement de la β -arrestine2 seraient éloignés du squelette macrocyclique. Il serait intéressant de comparer, par des études de modélisation moléculaire et d'arrimage au récepteur, les conformations adoptées par l'apéline-13 et par le AM02-46, ce dernier possédant une affinité et une puissance sur la voie β -arrestine2 voisine du ligand naturel. Cela nous permettrait d'identifier avec plus de certitudes les

résidus interagissant avec l'acide aminé en C-terminal, et surtout nous aurions une meilleure compréhension de l'espacement entre les deux épitopes et du rôle structurant primordial qu'occupe le squelette macrocyclique. Nous pourrions ainsi remplacer ce dernier par des fragments synthétiques plus petits et plus simples. C'est dans cette optique que nous avons synthétisé deux analogues présentant des modifications au sein du macrocycle, en conservant un résidu Pro avant le Tyr(OBn). L'enchaînement peptidique Lys-Gly-Pro a été substitué par l'acide 8-aminooctanoïque (**AM02-41**), et par une succession de deux résidus β -Ala (**AM02-48**) (**Figure 28**). Bien que la taille des cycles soit proche de celui de l'analogue référence **AM02-24** (16 atomes au lieu de 17), l'absence de chaînes latérales et de liaisons peptidiques intracycliques confère une augmentation considérable de la flexibilité et de la lipophilicité du squelette macrocyclique. Les répercussions de ce bouleversement conformationnel ne sont pas négligeables. En effet, l'analogue **AM02-41** présente un profil pharmacodynamique extrêmement intéressant et tout à fait inédit. Il possède une affinité moins bonne que l'apéline-13 mais qui reste tout de même acceptable ($IC_{50} = 36$ nM). Au niveau signalétique, **AM02-41** apparaît comme un ligand biaisé puisqu'il n'inhibe pas la formation d'AMPc tout en activant avec une bonne puissance le recrutement partiel de la β -arrestine2 ($EC_{50} = 120$ nM, E_{max} 60%). Il s'agit du premier composé apélinergique présentant une telle sélectivité fonctionnelle. Les perspectives d'utilisations de cet outil pharmacologique sont multiples, il pourrait permettre d'étudier le rôle de la voie canonique d'APJ dans des effets physiologiques impliquant le système apélinergique. L'insertion d'une liaison peptidique et donc d'une rigidité au sein du macrocycle (**AM02-48**) conduit à d'importantes pertes d'affinité et de signalisation (**Figure 28**). De toute évidence, la conformation adoptée par le cycle est un point crucial à l'interaction avec APJ et au bon positionnement du résidu C-terminal dans sa poche de liaison. Nous avons pour objectif de poursuivre sur cette lancée et de concevoir des analogues proposant des modifications structurales du cycle variées afin d'évoluer vers des molécules moins peptidiques et plus proches d'un candidat thérapeutique tout en conservant des propriétés pharmacodynamiques intéressantes.

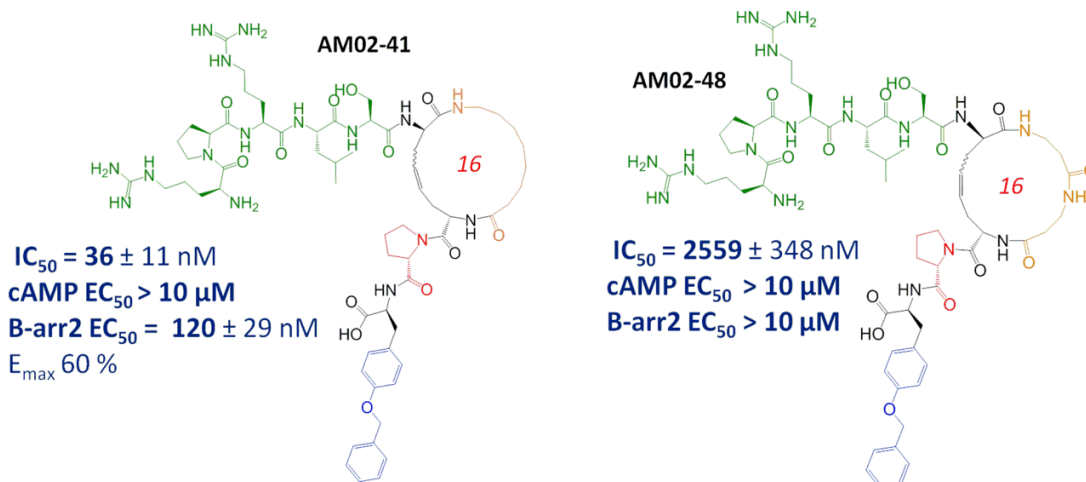


Figure 28. Effets de la modification du squelette macrocyclique sur l'affinité et la signalisation. La portion N-terminale en vert est la même que celle de l'apéline-13. Le résidu Tyr(OBn) est indiqué en bleu. L'acide aminé servant d'espaceur est en rouge. Les modifications dans le squelette cyclique par rapport au composé référence AM02-24 sont représentées en orange. Le chiffre en rouge indique la taille du cycle.

Dans le même ordre d'idée, nous avons débuté une étude préliminaire visant à simplifier la portion N-terminale peptidique Arg-Pro-Arg-Leu-Ser. Les travaux de Langelaan ont suggéré que les chaînes latérales des deux résidus Arg feraient des interactions électrostatiques avec les résidus Asp²⁰ et Glu²³ du récepteur et que la distance entre les deux fonctions guanidines serait de l'ordre de 9 Å ce qui est faible à l'échelle moléculaire (Langelaan et al., 2013). La chaîne latérale hydroxyle du résidu Ser serait impliquée dans la stabilisation d'un tournant β au sein de ce fragment N-terminal (Macaluso and Glen, 2010). Nous avons donc voulu dans un premier temps déterminer si les fonctions guanidines des deux résidus Arg étaient indispensables au maintien de l'affinité pour APJ. En prenant comme structure de référence le premier macrocycle **AM02-24**, les deux acides aminés Arg ont été remplacé par des Lys (**AM02-50**) et par des ornithines (**AM02-49**) dont la chaîne latérale est un peu plus courte (**Figure 29**). Ces acides aminés possèdent des fonctions amines pouvant également faire des interactions ioniques avec les résidus Asp et Glu du récepteur. Les pertes d'affinité par rapport au macrocycle référence se sont révélées très légères, un facteur 2 à peine (22.2 nM et 23.8 nM vs. 10.4 nM). De plus, la différence de longueur de chaîne entre les Lys et les ornithines ne semblent pas avoir eu d'impact. Bien souvent, les guanidines interagissent avec les fonctions carboxylates des Asp et Glu

d'un récepteur par des ponts salins qui résultent à la fois des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes (Langelaan et al, 2013). Dans ce cas, nous nous attendrions à ce que les substitutions par des fonctions amines diminuent la liaison avec le récepteur, puisque la capacité de liaisons hydrogènes des amines est inférieure à celle des guanidines. Bien que cela reste hypothétique, l'analyse de ces résultats suggère que les interactions seraient davantage électrostatiques (ou ioniques) renforçant ainsi les conclusions de l'étude du groupe de Rainey.

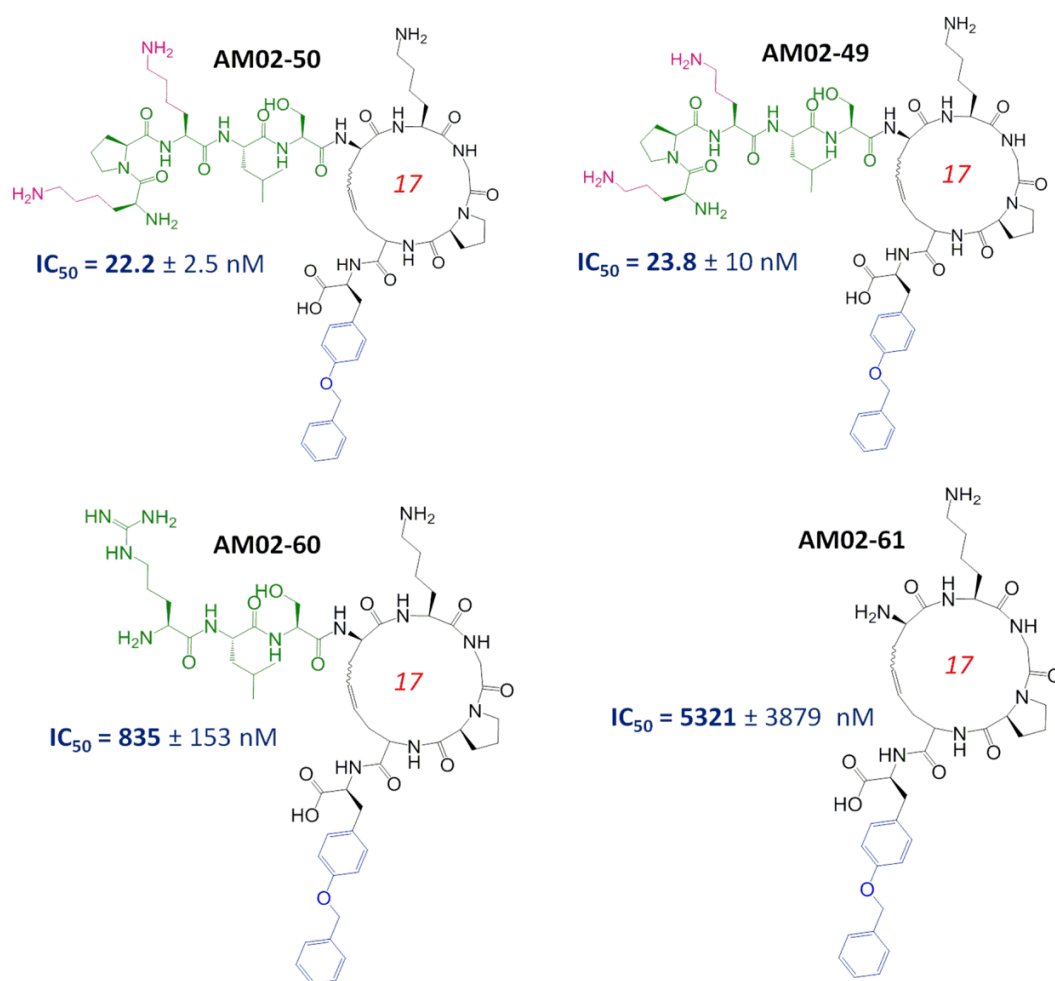


Figure 29. Modifications du fragment N-terminal du macrocycle référence AM02-24 et résultats en radioliation. La portion N-terminale en vert est la même que celle de l'apéline-13. Le résidu Tyr(OBn) est indiqué en bleu. Les chaînes latérales des Lys et des ornithines sont représentées en rose. Le chiffre en rouge indique la taille du cycle.

Nous avons synthétisé et étudié en radioliation deux macrocycles dont la partie N-terminale a été tronquée. La suppression des acides aminés Arg-Pro (AM02-60) entraîne

d'importantes pertes d'affinités par rapport à **AM02-24** (835 nM vs. 10.4 nM), tandis que le retrait total du fragment Arg-Pro-Arg-Leu-Ser (**AM02-61**) conduit à une affinité de l'ordre de 5 μ M (**Figure 29**). Bien que mauvais, ces résultats sont très prometteurs. Un seul résidu Arg permet de maintenir une affinité submicromolaire. A notre grande surprise, en absence du motif peptidique N-terminal, le squelette macrocycle et le résidu Tyr(OBn) C-terminal semblent tout de même capables de déplacer l'apéline-13 radiomarquée. Les perspectives ouvertes par ces analogues tronqués sont considérables. Il serait intéressant d'évaluer l'importance de la chaîne latérale lipophile du résidu Leu et de l'hypothétique tournant β impliquant le résidu Ser. Bien que la mutation du résidu Leu⁵ en Ala avait conduit à une perte significative d'affinité (Medhurst et al., 2003), il est probable que ces nouveaux analogues macrocycliques n'aient pas le même positionnement que l'apéline-13 dans le site orthostérique du récepteur. Alors que nous avons plusieurs évidences quant à l'importance des résidus Arg, il est possible que les acides aminés Leu et Ser ne servent que d'espaceurs entre le cycle et les fonctions guanidines. Afin de valider cette hypothèse, nous prévoyons de les supprimer et de les remplacer par des acides aminés neutres espaceurs aliphatiques de différentes longueurs. Le but est clairement de s'assurer que les deux principaux pharmacophores soient les fonctions guanidines. Le concours d'une étude de modélisation moléculaire permettrait de mieux estimer la distance requise entre le cycle et les fonctions guanidines. La conception d'un fragment synthétique non peptidique simplifié à la place de la portion N-terminale Arg-Pro-Arg-Leu-Ser nous rapprocherait d'une molécule ciblant APJ au profil "drug-like". Bien évidemment, ce raisonnement de SAR ne prend en compte que la liaison au récepteur et non l'activation des différentes voies de signalisation. Outre notre objectif de comprendre les déterminants moléculaires responsables de l'engagement des différentes protéines G et des effecteurs intracellulaires associés à APJ, puis d'identifier leurs rôles respectifs dans la douleur et l'hypotension, notre objectif consiste également à faire évoluer la structure du ligand vers une molécule plus proche d'un potentiel candidat clinique.

En parallèle, nous avons débuté une étude préliminaire visant à déterminer les effets des nouveaux analogues macrocycliques sur la pression sanguine chez les rats mâles Sprague-Dawley. Après anesthésie avec un mélange kétamine / xylazine, l'apéline-13, les

analogues **AM02-24** et le **AM02-46** ont été administrés par voie i.v. dans la jugulaire à 0.1 mg/kg, puis les pressions systolique et diastolique ont été mesurées dans l'artère carotidienne. L'apéline-13 et les deux analogues provoquent une rapide diminution de la pression sanguine qui atteint un maximum 20 à 30 secondes après administration. De façon surprenante, le macrocycle **AM02-46**, qui a une affinité et un recrutement de la β -arrestine2 similaires au ligand endogène, induit un puissant effet hypotenseur à peu près deux fois supérieur à l'apéline-13 et à **AM02-24** (**Figure 30**).

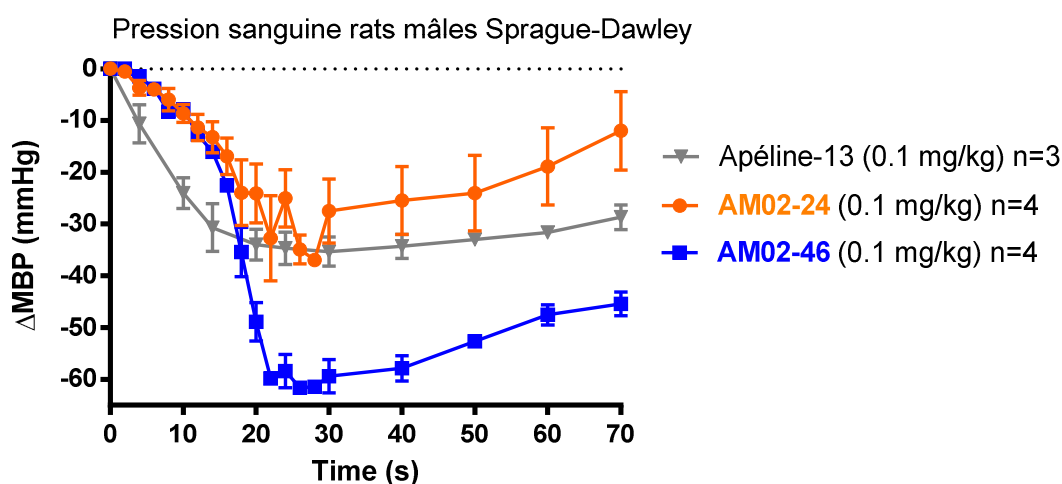


Figure 30. Effets hypotenseurs de l'apéline-13 et de 2 analogues macrocycliques chez le rat mâle Sprague-Dawley. L'apéline-13 et le AM02-24, à 0.1 mg/kg diminue la pression sanguine, par rapport au niveau basal, de 30 mmHg entre 20 et 30 secondes après administration. L'analogue AM02-46 induit un puissant effet hypotenseur, faisant chuter la pression sanguine de l'animal de 60 mmHg.

Les travaux précédents ont permis d'associer indirectement le recrutement des β -arrestines aux effets hypotenseurs *in vivo* (Lee et al., 2005; Margathe et al., 2014). Ces premiers résultats encourageants nous amènent à vouloir investiguer les messagers secondaires dépendants de l'internalisation d'APJ et de l'engagement des β -arrestines. Nous ciblerons en premier les mécanismes liés à l'oxyde nitrique qui ont été associé en 2001 aux effets hypotenseurs induits par le système apélinergique (Tatemoto et al., 2001) (**voir introduction figure 11**). Nous chercherons ainsi à identifier les effecteurs intracellulaires intermédiaires activés par APJ qui mènent à la synthèse d'oxyde nitrique, Akt étant un candidat privilégié. Ainsi, nous identifierons le probable biais signalétique relié au composé **AM02-46** expliquant cette importante différence physiologique. Les macrocycles

présentant une bonne affinité pour APJ seront testés sur davantage de voies de signalisation, et les composés les plus intéressants seront également évalués *in vivo* sur le modèle de douleur tonique formaline, et en pression artérielle. Nous examinerons l'impact des modifications chimiques sur la demi-vie plasmatique *in vitro* puis *in vivo*, ainsi que le profil de dégradation protéolytique. Cette nouvelle approche macrocyclique représente donc une avenue prometteuse pour se rapprocher d'un composé plus petit et moins peptidique offrant un meilleur profil pharmacocinétique. Ces molécules constituent également de formidables outils pharmacologiques pour sonder les voies de signalisation impliquées dans les effets analgésiques et tenseurs du système apélinergique.

CONCLUSION

L'apéline et son récepteur couplé aux protéines G, APJ, fait l'objet d'un intérêt grandissant dans la littérature. Ce système est impliqué dans de nombreux effets physiologiques, cependant les connaissances en termes de relations structure-fonction restent encore très obscures à ce jour. Ce projet a eu pour but initial de mieux identifier les déterminants moléculaires responsables de l'interaction du ligand avec son récepteur et l'activation de diverses voies de signalisation, par la synthèse d'analogues de l'apéline-13 modifiés à des positions clés. Si au départ nous avions pour objectif de nous intéresser essentiellement aux effets analgésiques de l'apéline, nous avons rapidement également investigué le volet hypotenseur de notre cible.

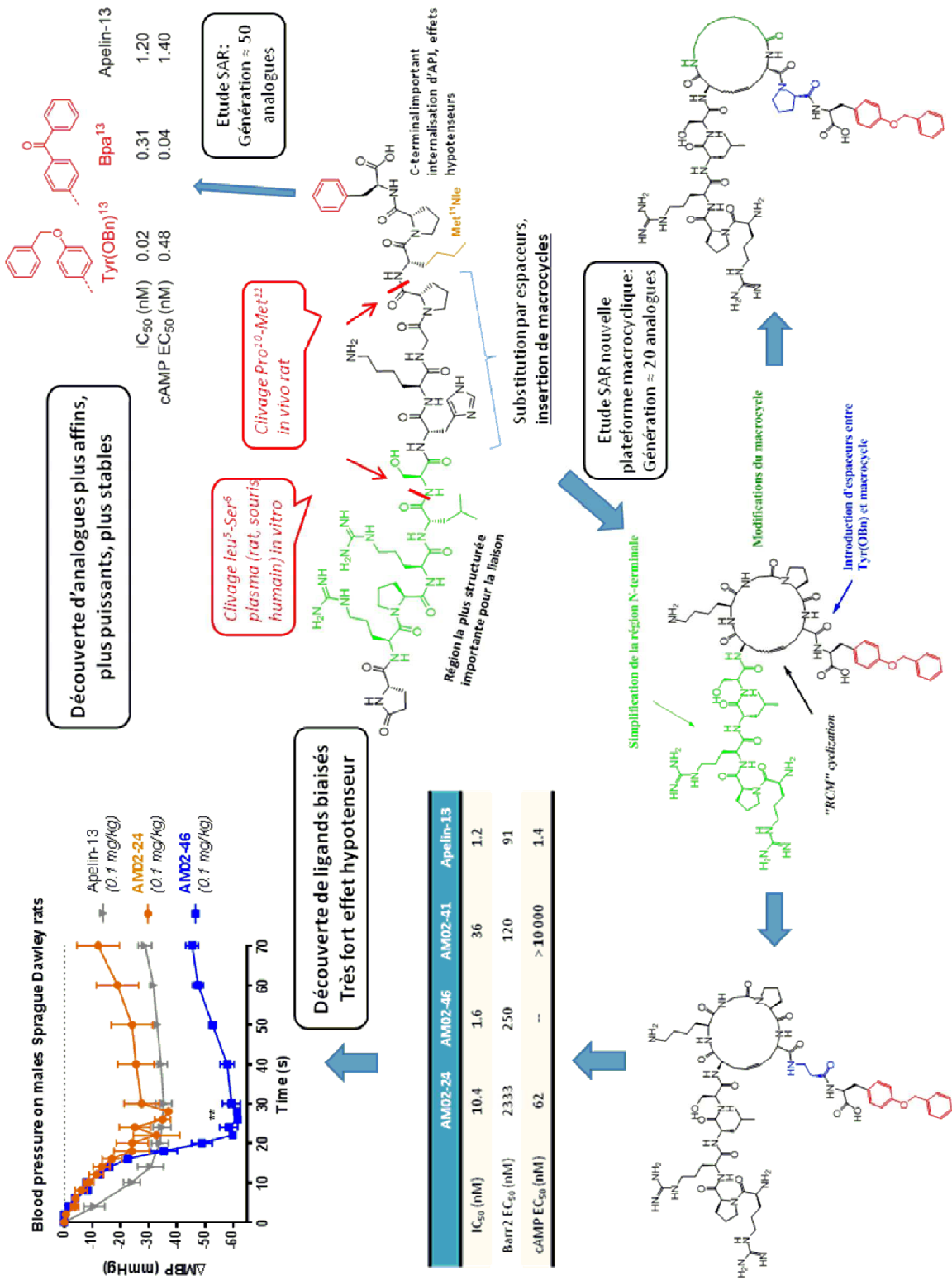
Nous avons débuté ce projet par la synthèse d'analogues de l'apéline-13 modifiés en C-terminal, Pro¹² et Phe¹³, par une variété d'acides aminés non naturels possédant des structures permettant de sonder la poche C-terminale du récepteur APJ. Nous avons étudié la capacité de ces composés à se lier au récepteur et à activer les voies de signalisation AMPc et β -arrestine2. Cela nous a permis de raffiner nos connaissances de la SAR, de souligner le rôle des interactions π en C-terminal et de suggérer que des interactions de type lipophiles seraient suffisantes au maintien d'une affinité comparable à celle du ligand naturel pour APJ. L'importante diversité des analogues proposant des modifications chimiques à la place du résidu Phe¹³ nous a permis de découvrir plusieurs composés aux propriétés pharmacodynamiques très intéressantes (affinité, voies de signalisation). Ces molécules de haute affinité et puissance (Tyr(OBn)¹³, Bpa¹³, (L- α -Me)Phe¹³) sont des outils pharmacologiques de grand intérêt visant à sonder le rôle du système apélinergique dans des effets physiologiques associés. D'autre part, la caractérisation signalétique approfondie de l'engagement des protéines G et des β -arrestines induits par les analogues 1Nal¹³ et 2Nal¹³ a mené à une différence de sélectivité fonctionnelle défavorisant la voie AMPc. Ces composés, lorsqu'évalués *in vivo* dans un modèle de douleur tonique, ont présenté des effets analgésiques significativement différents. Nous avons pu suggérer une corrélation entre le biais signalétique et l'antinociception, puis une étude de modélisation moléculaire préliminaire de ces analogues arrimés à APJ a mis en lumière une différence de

conformation non négligeable des chaînes latérales 1Nal et 2Nal. Des investigations supplémentaires pourraient nous permettre d'identifier les résidus du récepteur impliqués dans cette sélectivité fonctionnelle en lien avec les effets analgésiques du 2Nal¹³.

Dans un autre volet du projet, nous nous sommes intéressés à la stabilité plasmatique de l'apéline-13 et de ses analogues. Nous avons réalisé la première étude visant à déterminer le profil de dégradation protéolytique de l'apéline-13 *in vitro* puis *in vivo*. Des nouveaux sites de clivage de première et de seconde génération ont été mis en évidence. Il sera ainsi possible de cibler nos futures modifications chimiques afin de réduire la dégradation de nos composés. Nous savons d'ores et déjà que l'acide aminé en C-terminal semble avoir un important impact pour la demi-vie plasmatique des analogues. Cette étude avait clairement pour but de nous permettre de concevoir de meilleurs outils pharmacologiques d'un point de vue pharmacocinétique. Dans cette optique, nous nous sommes en parallèle penchés sur une approche macrocyclique de notre étude de SAR. Cette partie la plus récente du projet vise également à simplifier et à réduire la taille de nos molécules afin d'évoluer vers une structure plus proche du médicament. Nous avons obtenu des macrocycles possédant des affinités équivalentes au ligand naturel démontrant ainsi le potentiel de cette nouvelle organisation structurale. Nous nous intéressons aux effets hypotenseurs de l'apéline, les premiers résultats sont déjà très encourageants, un analogue ayant démontré un effet hypotenseur bien supérieur à celui de l'apéline-13. Une étude préliminaire de la SAR de cette nouvelle classe de composés nous a conduit à la découverte d'un macrocycle à la signalisation biaisée en faveur du recrutement de la β -arrestine2 et n'activant pas la voie AMPc. Ce ligand a un profil tout à fait inédit dans le système apélinergique que nous évaluerons dans nos essais physiologiques de douleur et de pression sanguine.

Si ce projet vise en grande partie à identifier les voies de signalisation responsables des effets physiologiques qui nous intéressent par l'utilisation d'analogues de l'apéline-13, il a également un objectif de recherche translationnelle pour, à plus long terme, conduire à la découverte d'un potentiel candidat clinique. Contrairement au processus des entreprises pharmaceutiques faisant intervenir un criblage à haut débit menant à la découverte d'une petite molécule "Lead", notre approche classique s'avère être bien plus longue, le point de départ étant le ligand endogène. Toutefois, l'étude n'en est que plus passionnante et représente, à mes yeux, un très beau défi auquel j'ai pu apporter ma contribution.

Résumé des travaux - Projet Apéline



REMERCIEMENTS

Je souhaite, en premier lieu, remercier mes directeurs de recherche, les professeurs Éric Marsault et Philippe Sarret pour m'avoir donné la chance de réaliser mon Ph.D. dans leurs laboratoires. Le laboratoire d'Éric, lors de mon arrivée, n'était alors que très peu peuplé. En effet, j'ai été, avec mon collègue Éloïc, son premier étudiant au doctorat. Le laboratoire a rapidement connu une énorme ascension (matériel, étudiants) et c'est grâce à Éric que j'ai pu mener mon projet dans les meilleures conditions. Éric a été plus qu'un simple directeur, il a été présent moralement dans les premiers mois de mon arrivée au Québec lorsque c'était difficile, je le remercie pour sa gentillesse, sa patience, et ses talents de pédagogue. Il m'a également donné beaucoup de liberté dans mon projet, ce que j'ai vraiment apprécié.

Je remercie à présent mon co-directeur Philippe pour son extrême gentillesse, sa générosité et sa bonne humeur constante qui a été pour moi une véritable source de motivation pour m'intégrer dans son laboratoire. En effet, en tant que chimiste, il n'a pas été facile d'apprivoiser et "dealer" avec des physiologistes, mais Philippe a su m'expliquer ces concepts, me mettre à l'aise, et me communiquer sa passion. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a apporté. Éric et Philippe ont énormément contribué à mon évolution tant sur le plan scientifique que humain.

J'exprime tous mes sincères remerciements aux collègues et amis des laboratoires Marsault et Sarret. Marc-André, Marie-Claude, Annie, Hassan, Antoine (que j'appelle affectueusement Rourou), Kumar, Lok-Hang (dit "Loki"), Adam, Pallavi, Christian (dit "le Professeur"), Marc (dit "Marcus"), Pierre-Luc (PLUC), Christine (ou Momo pour les intimes), Hugo, Éloïc (qui aime tant se faire nommer "mon Colombo"), Elie, Etienne, Marilena, Félix (ex-partenaire de Babyfoot), Alexandre D (dit "petit-Alex"), Nicolas (le roux), Elora, Alexandre P., Jessica, Mylène, Cécile, Mélisange, Patrick, les Karines, Jean-Michel, Pascal, Louis, Marc-André, David (le VRAI maudit Français), Mike, Jérôme... et tous ceux que j'ai peut-être oublié. Vous m'avez tous apporté beaucoup et contribué à mon épanouissement au Québec. Je remercie les différents stagiaires ayant travaillé sur mon

projet, Trang, Orlane, Stéphanie et dernièrement Laurent qui a fourni un travail exemplaire. Ces personnes ont été d'une grande aide et ont contribué à l'avancement du projet.

Je remercie et exprime toute mon amitié à la "gang" de Français avec qui j'ai passé des moments inoubliables, Antoine, Steph, Marc, Elie, Christine, Céline, Nico, Xavier, Cyrielle. Un remerciement très spécial à Elie qui m'a enseigné et transmit toutes ses connaissances en pharmacologie des GPCR au chimiste ignorant que j'étais. Avec lui et Christine, nous avons eu un nombre incalculable de discussions scientifiques passionnantes durant lesquelles nous "refaisons le monde". C'est également en partie grâce à eux que j'ai pu tant évoluer. Je n'oublie pas mon super colloque Marc qui a été présent pour me remonter le moral dans les pires moments. Les mêmes chaleureux remerciements à Antoine et Steph, vous avez été comme une seconde famille au Québec.

Ma famille en France, ma mère, mon père, mon frère, mon grand-père. Vous avez toujours cru en moi et m'avez poussé le plus haut possible. Enfin, Julie et sa petite famille, ça a été dur d'être aussi loin de vous. Tu as toujours eu les mots justes pour me donner du courage.

Je tiens à remercier l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke (IPS) pour m'avoir accordé deux bourses, également Protéo et le Centre des Neurosciences de Sherbrooke pour des bourses de congrès et enfin la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé (FMSS).

Finalement, je remercie les membres de mon jury de thèse, les professeurs David Chatenet de l'Institut Armand-Frappier de Laval, Jana Stankova du département de pédiatrie de l'Université de Sherbrooke et Michel Grandbois, directeur du département de pharmacologie, qui ont accepté de prendre de leurs temps pour évaluer cette thèse.

ANNEXES

A. Procédures de synthèse

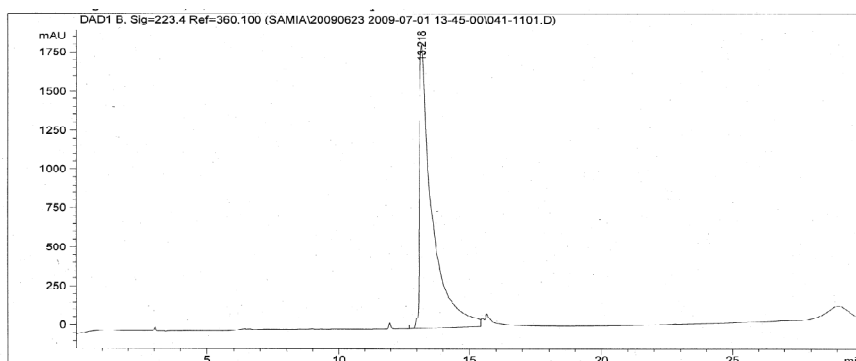
Les procédures sont décrites dans les parties expérimentales des articles 1 et 3.

B. Procédures des essais pharmacologiques

Les procédures sont décrites dans les parties expérimentales des articles 1 et 3.

C. Caractérisation des analogues

Les analogues ont été caractérisé par HPLC analytique et/ou HPLC-MS. Les chromatogrammes et spectres de masse sont représentés ci-dessous.

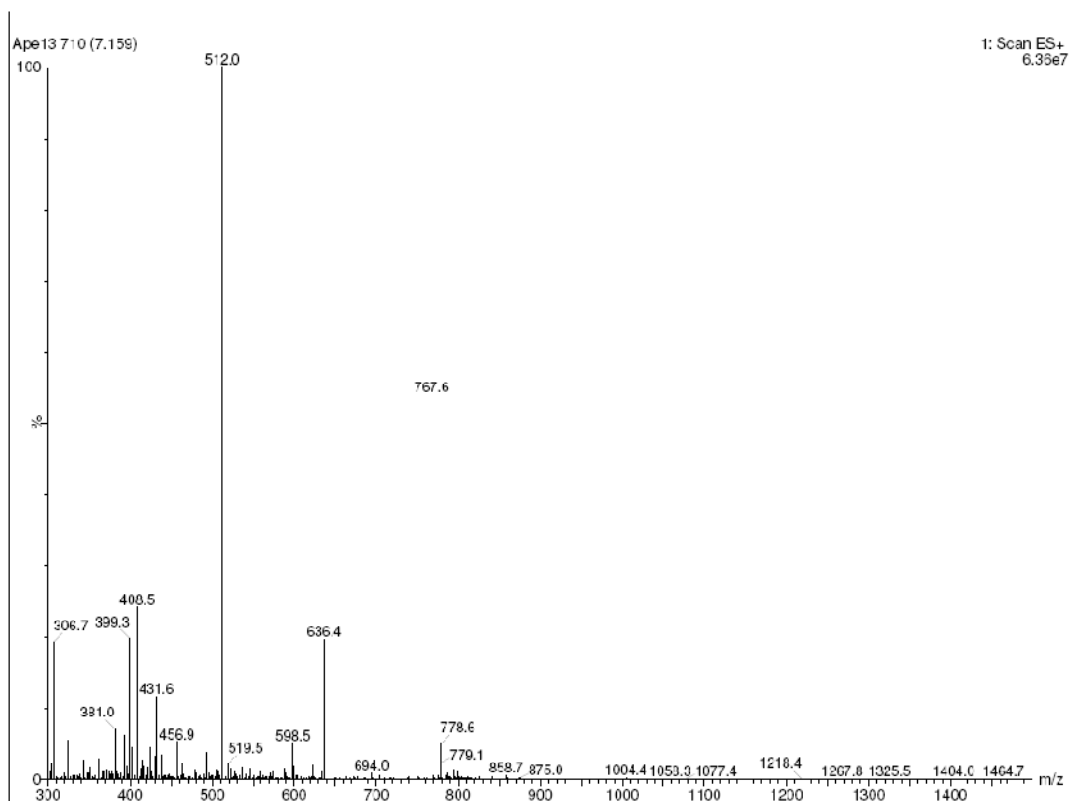
Apéline-13 : <Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

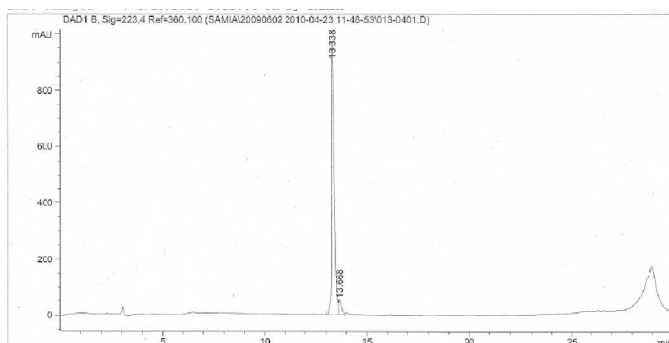
Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	13.218	BV	0.4536	6.06405e4	1816.00732	100.0000

Totals : 6.06405e4 1816.00732



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-F



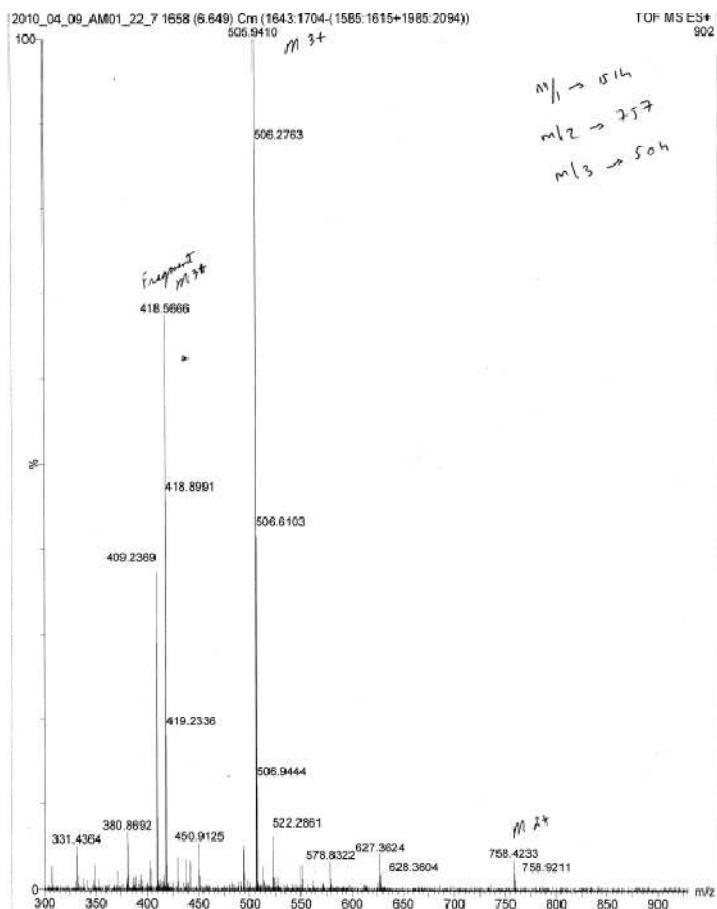
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

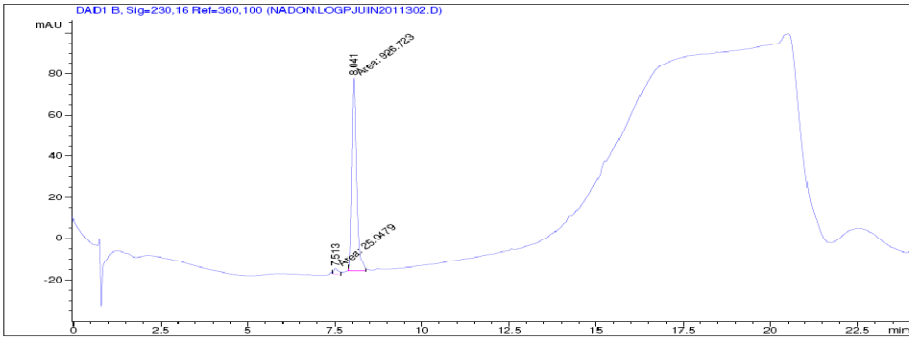
Signal 1: DAD1 B, Sig=223.4 Ref=360.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	13.338	BV	0.1347	8477.45605	963.28406	94.1007
2	13.668	VV	0.1548	531.46021	50.49570	5.8993

Totals : 9008.91626 1013.77975



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-(D)F

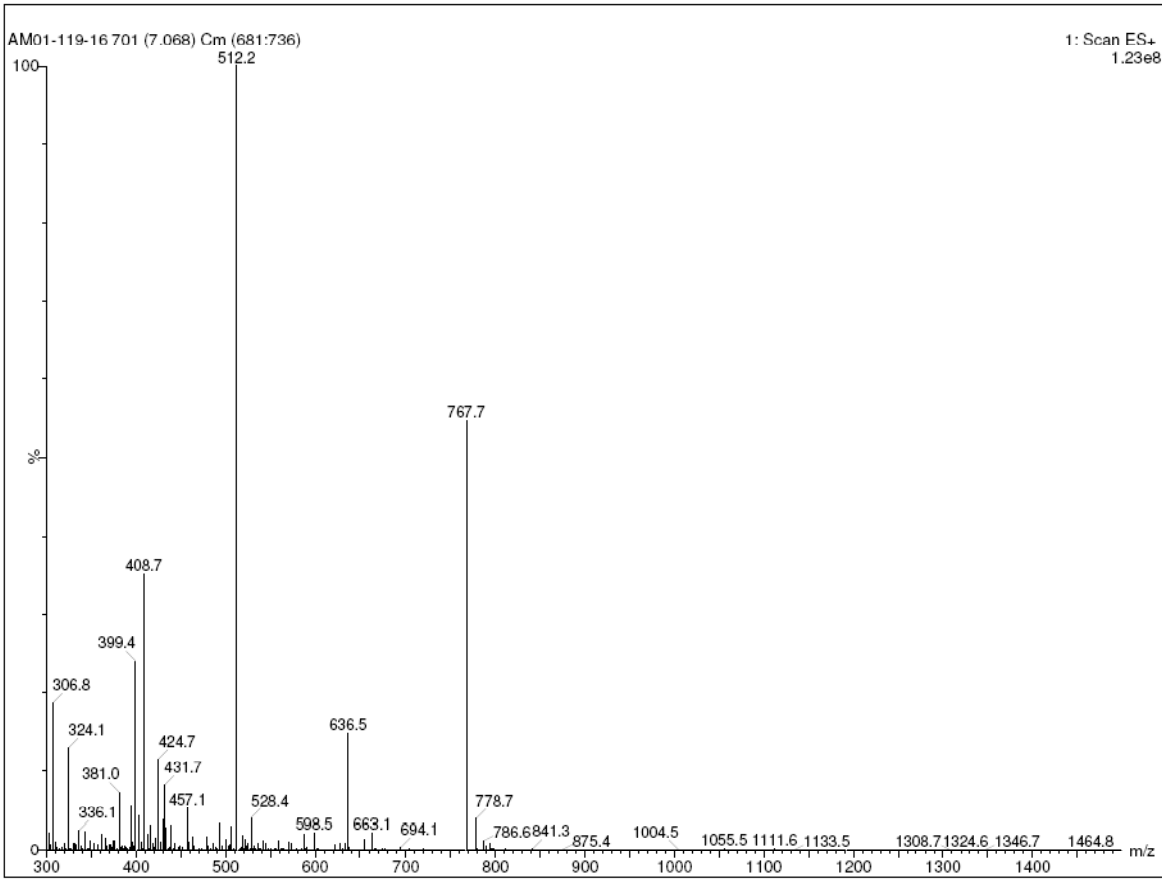


=====
Area Percent Report
=====

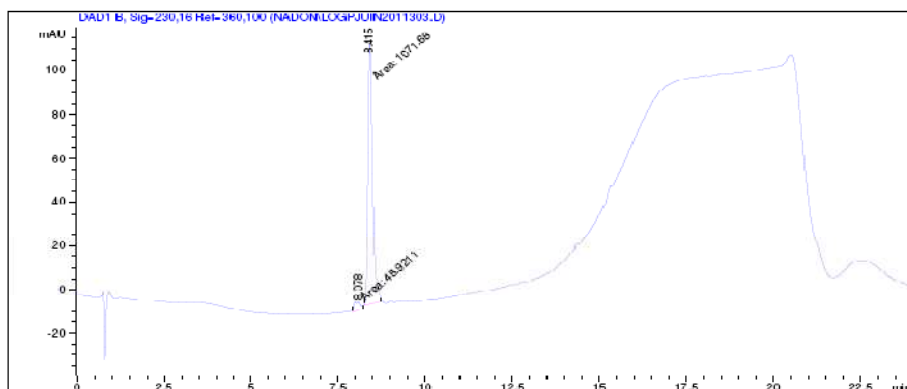
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.513	MM	0.1530	25.04794	2.71240	2.6317
2	8.041	MM	0.1646	926.72278	93.84174	97.3683
Totals :				951.77072	96.55414	



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-(D)P-F



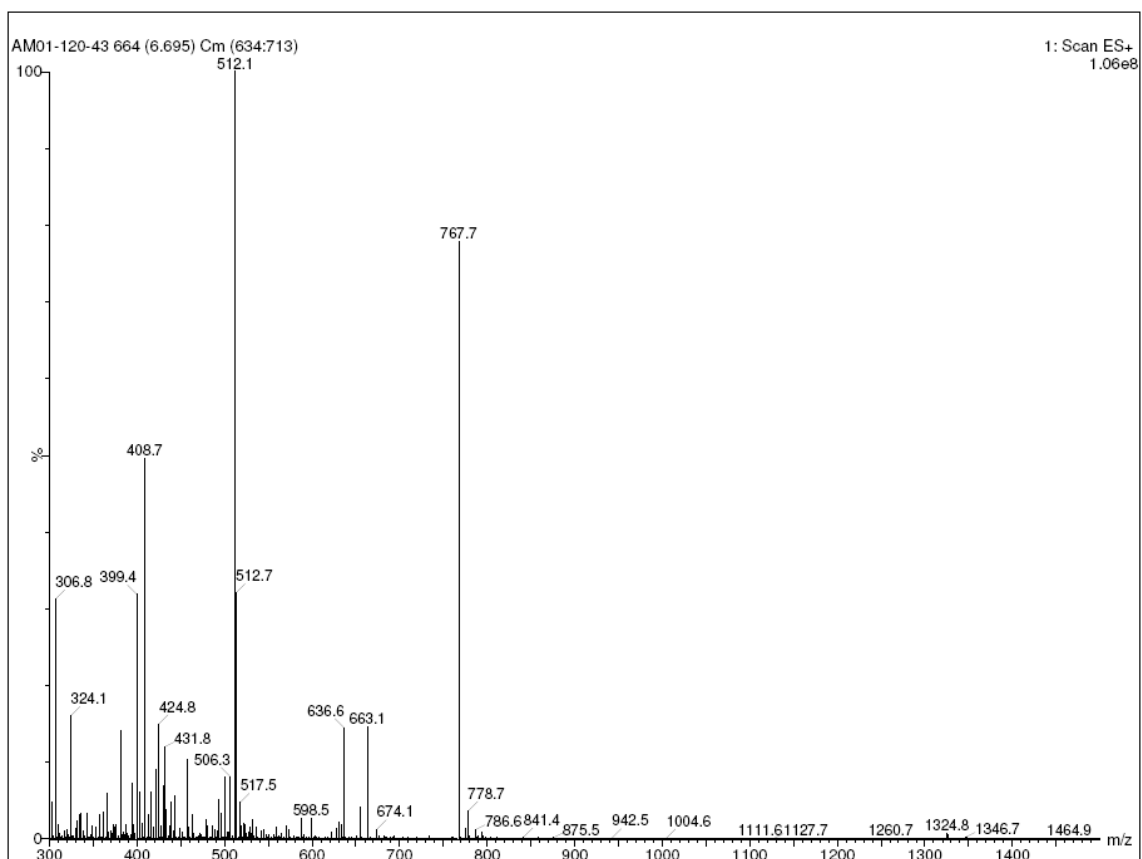
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISIDS

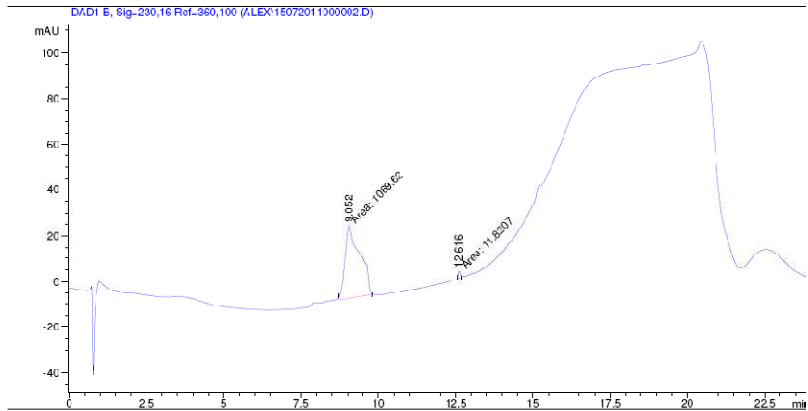
Signal 1: DAU1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.078	MM	0.2231	48.92110	3.65823	4.3656
2	8.415	MM	0.1502	1071.68042	118.92336	95.6344

Totals : 1120.60152 122.57859



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-(D)M-P-F



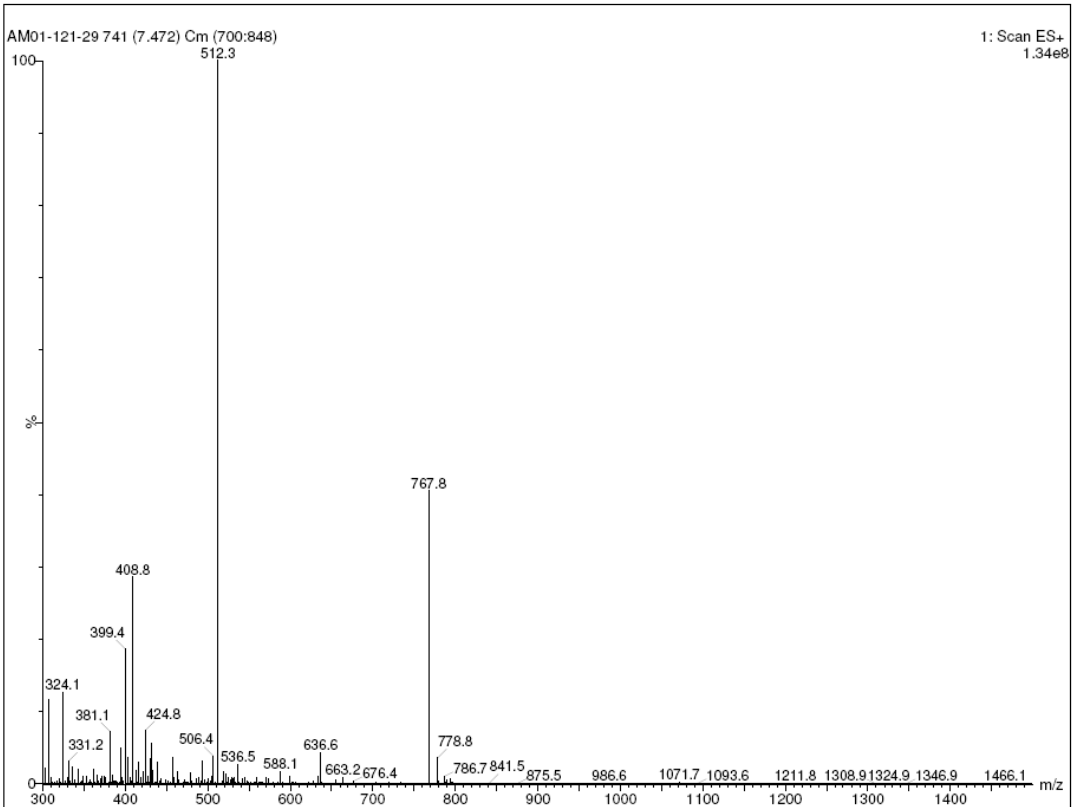
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

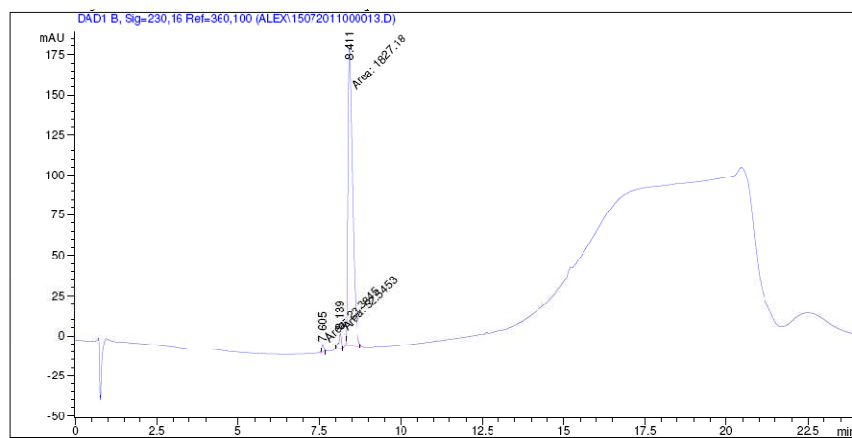
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.052	RM	0.5569	1069.62219	32.01064	90.9069
2	12.516	RM	0.0706	11.82073	2.79085	1.0931

Totals : 1081.44292 34.80149



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-(D)P-M-P-F



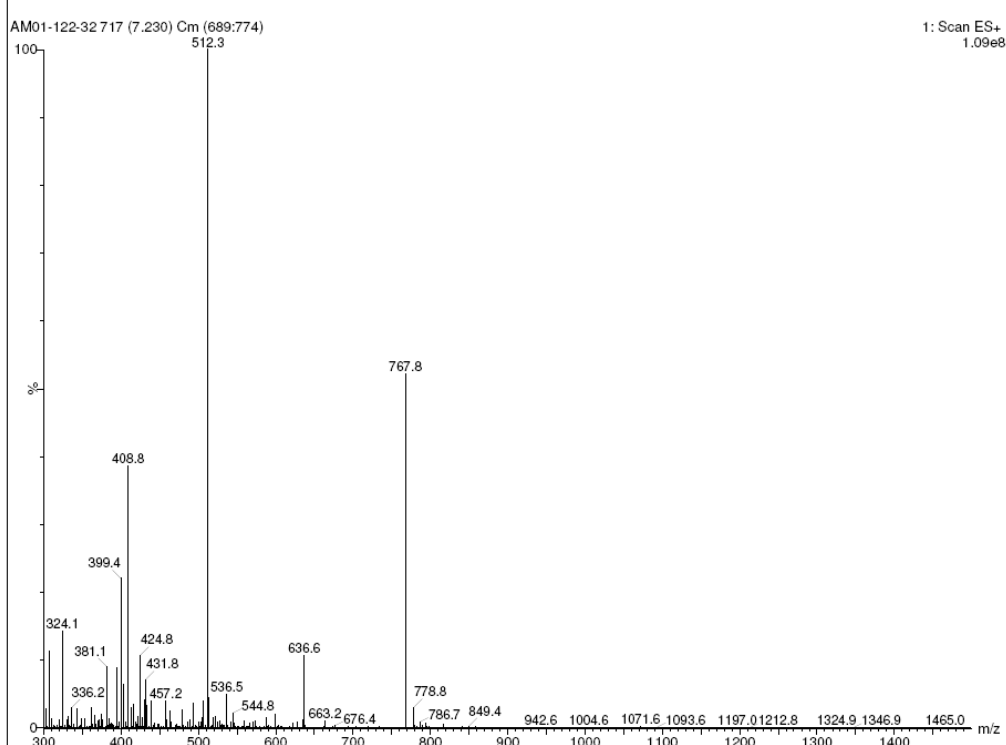
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

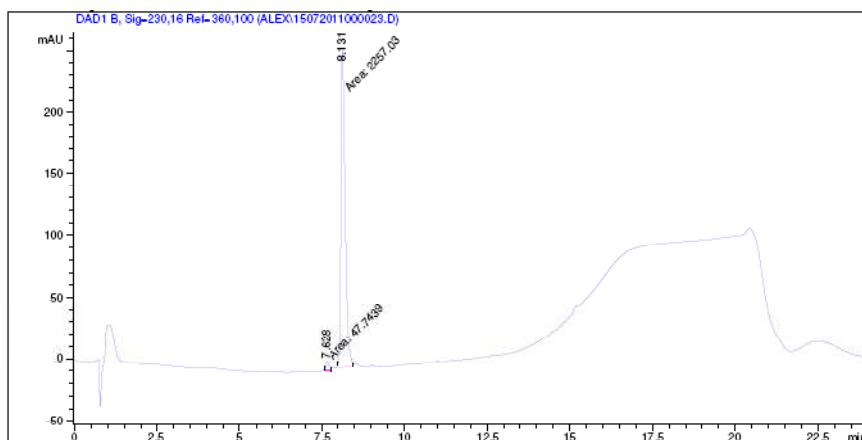
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.605	MM	0.0700	23.38455	5.56494	1.2288
2	8.139	MM	0.0904	52.54534	9.69245	2.7610
3	8.411	MM	0.1647	1827.17603	184.86440	96.0102

Totals : 1903.10591 200.12198



<Glu-R-P-R-L-S-H-(D)K-G-P-M-P-F



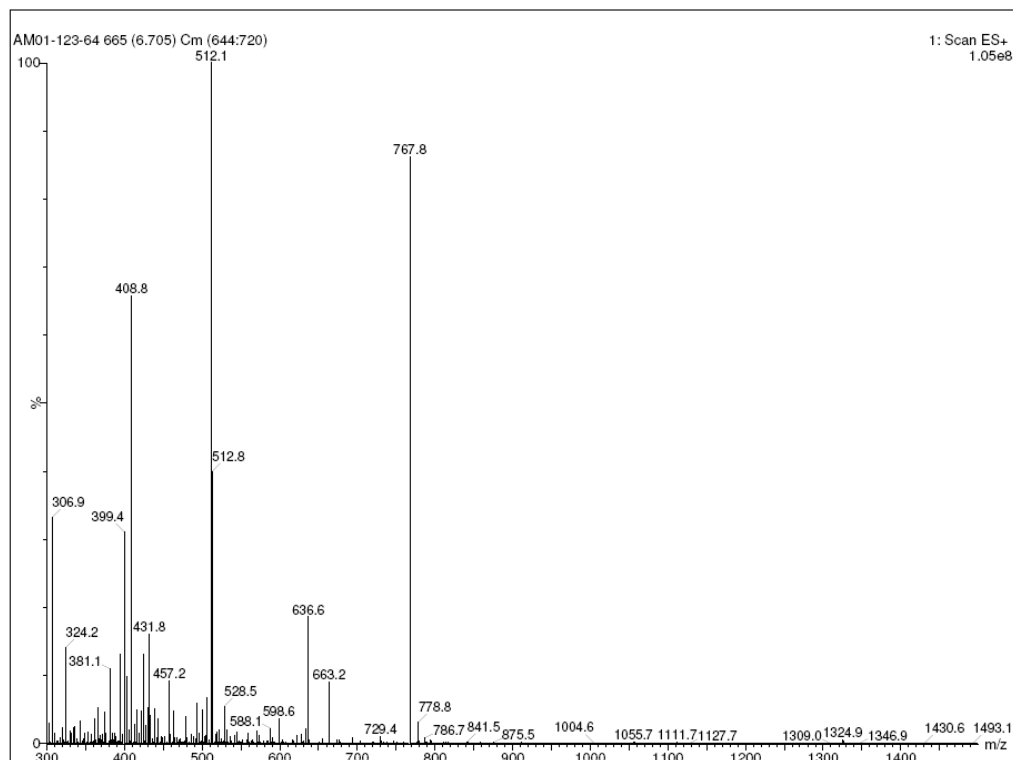
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

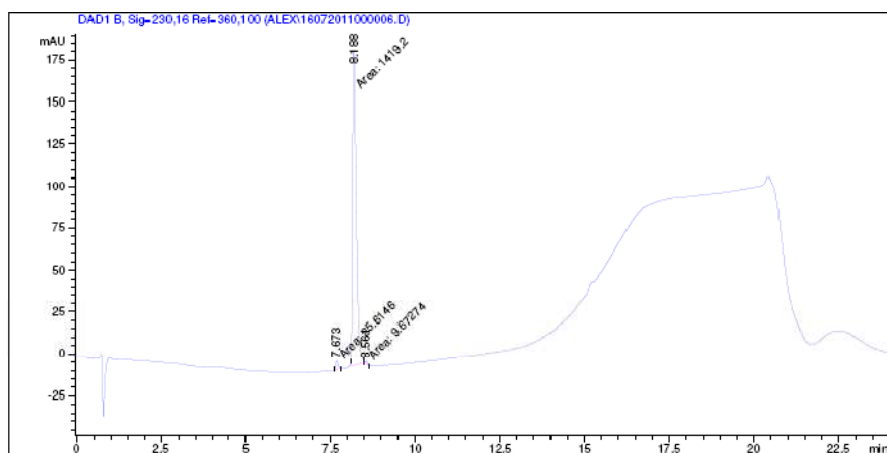
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.628	MM	0.1021	47.74391	7.78996	2.0715
2	8.131	MM	0.1462	2257.03101	257.32071	97.9285

Totals : 2304.77492 265.11067



<Glu-R-P-R-L-S-(D)H-K-G-P-M-P-F



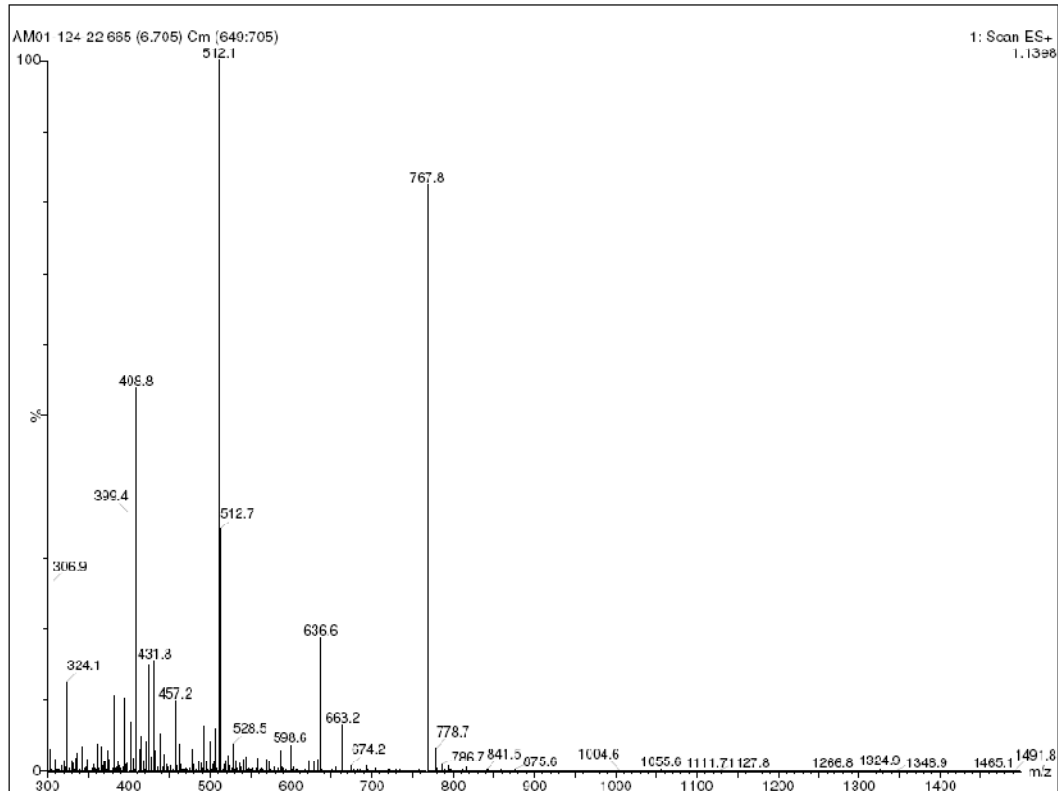
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

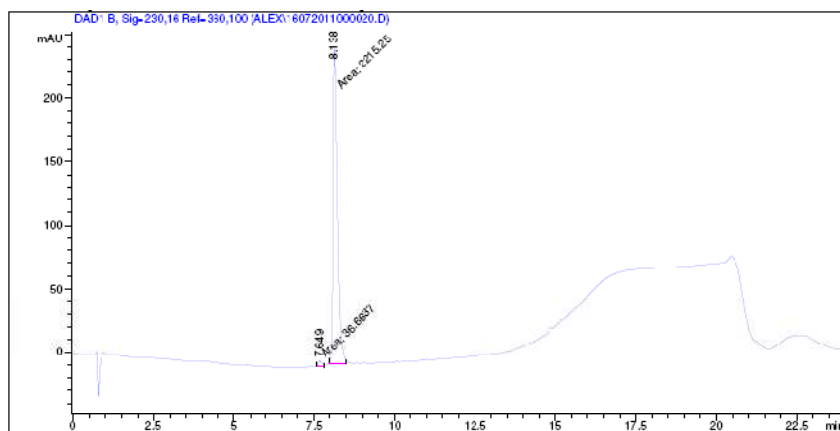
Signal 1: DAD1 B, Sig-230,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.673	MM	0.0784	25.61462	5.44513	1.7611
2	8.188	MM	0.1265	1419.19678	186.99345	97.5739
3	8.561	MM	0.0907	9.67274	1.77816	0.6650

Totals : 1454.48414 194.21675



<Glu-R-P-R-L-(D)S-H-K-G-P-M-P-F



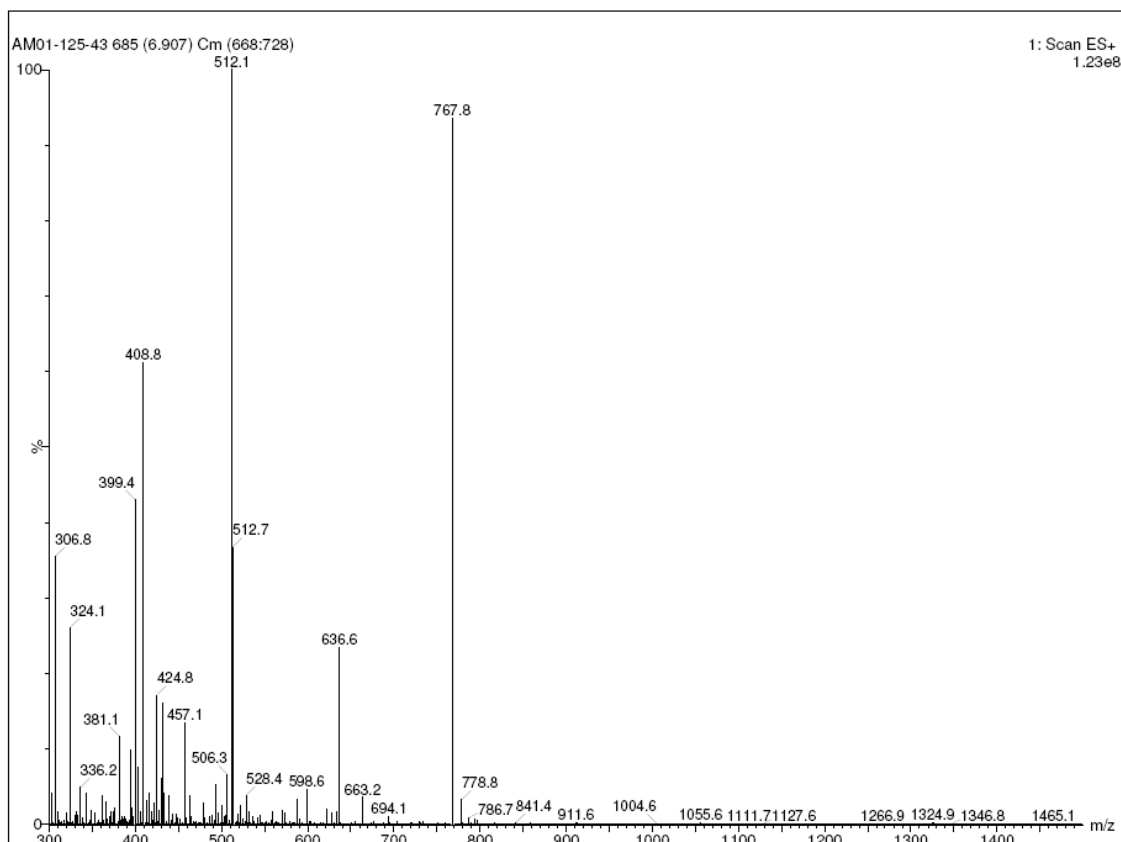
Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

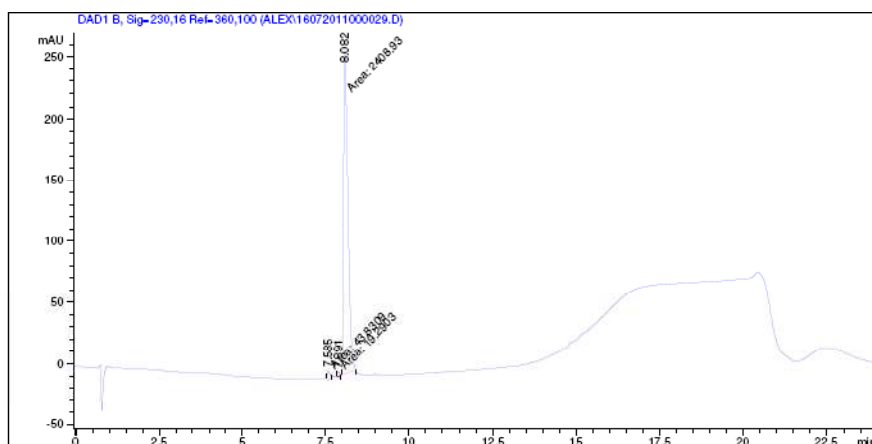
Signal 1: DAD1 B, Sig-230,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.649	MM	0.1203	36.66369	5.07856	1.6281
2	8.138	MM	0.1491	2215.25317	247.58510	98.3719

Totals : 2251.91686 252.66366



<Glu-R-P-R-(D)L-S-H-K-G-P-M-P-F



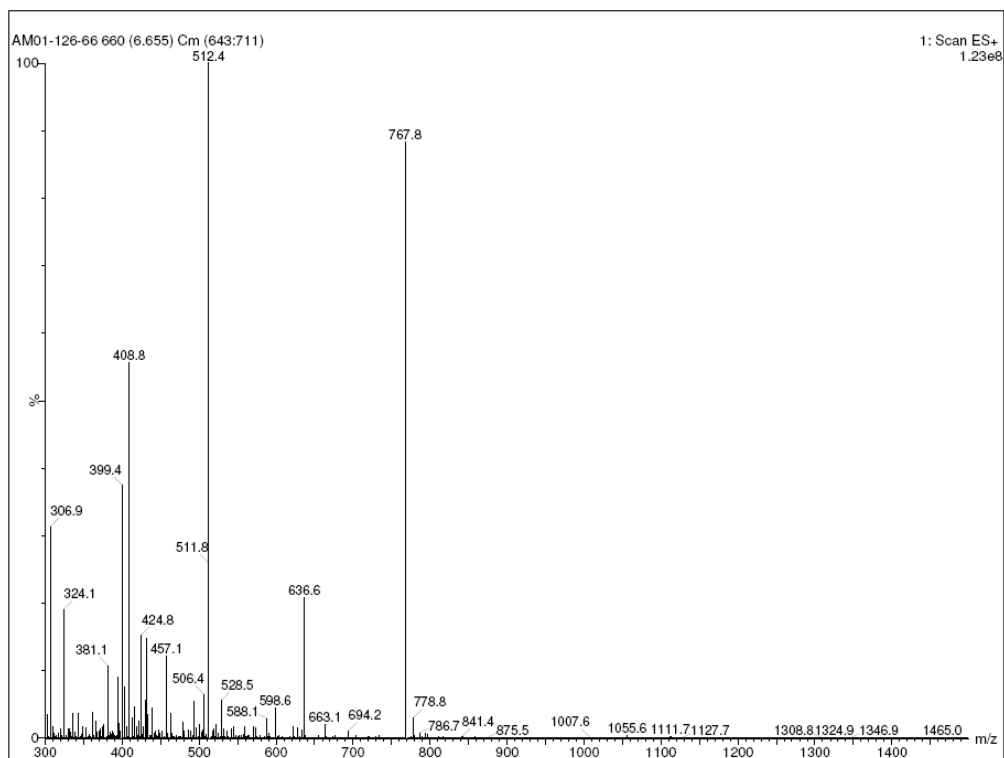
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

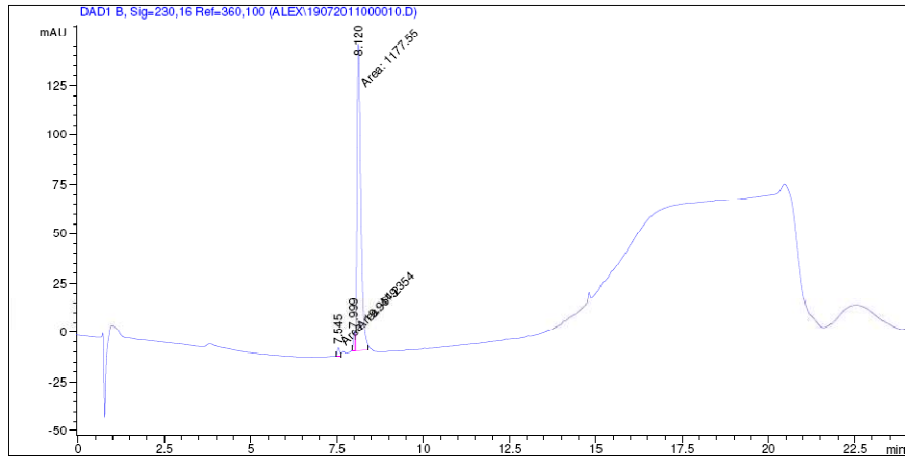
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.585	MM	0.0958	43.83091	7.62359	1.7731
2	7.891	MM	0.0773	19.29033	4.15744	0.7803
3	8.082	MM	0.1523	2408.93164	263.57275	97.4466

Totals : 2472.05287 275.35379



<Glu-R-P-(D)R-L-S-H-K-G-P-M-P-F



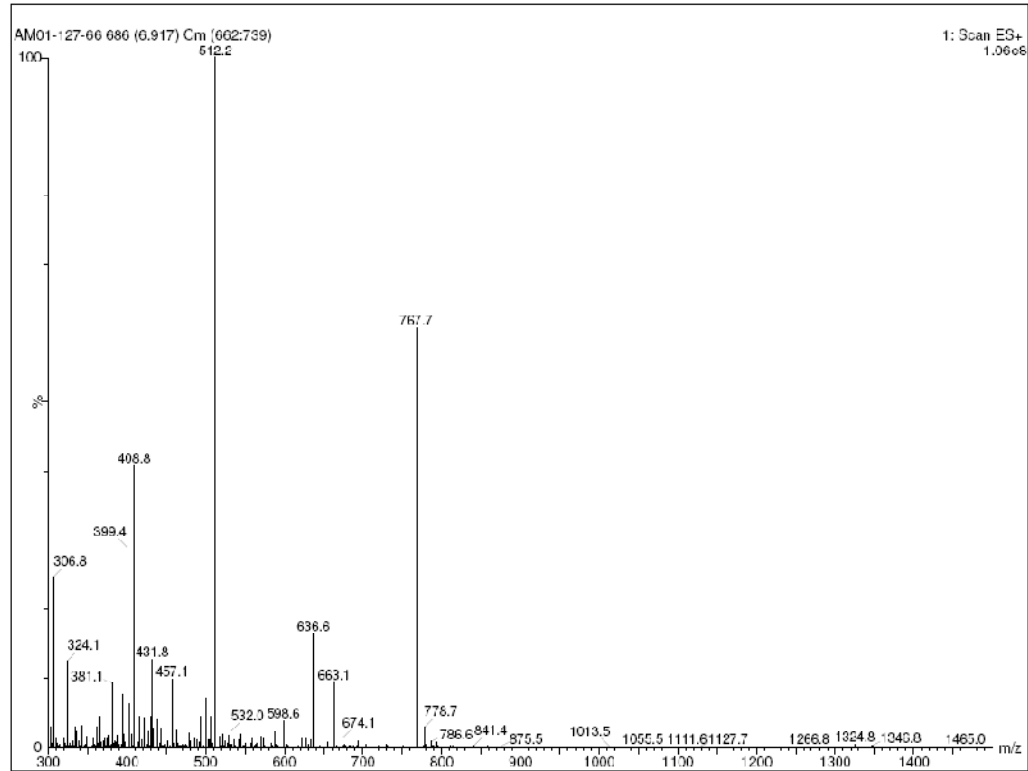
=====
Area Percent Report
=====

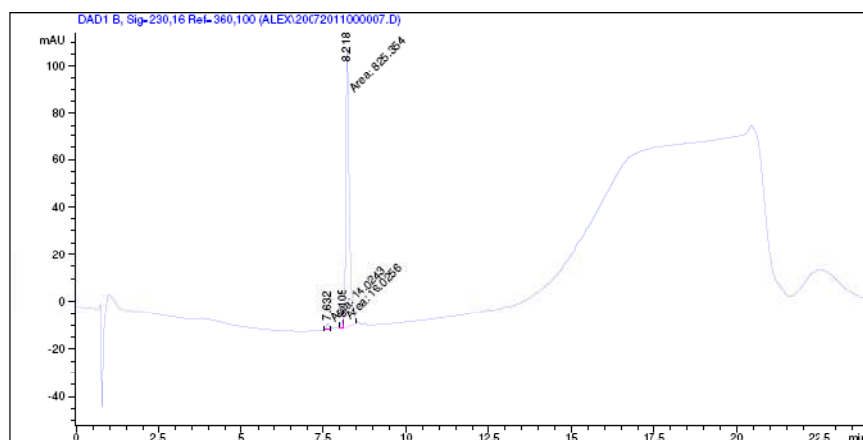
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISIDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.545	MM	0.0794	19.95490	4.18983	1.6109
2	7.999	MM	0.0707	41.23544	9.72048	3.3288
3	8.120	MM	0.1261	1177.54541	155.65309	95.0603

Totals : 1238.73575 169.56340



<Glu-R-(*D*)P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F

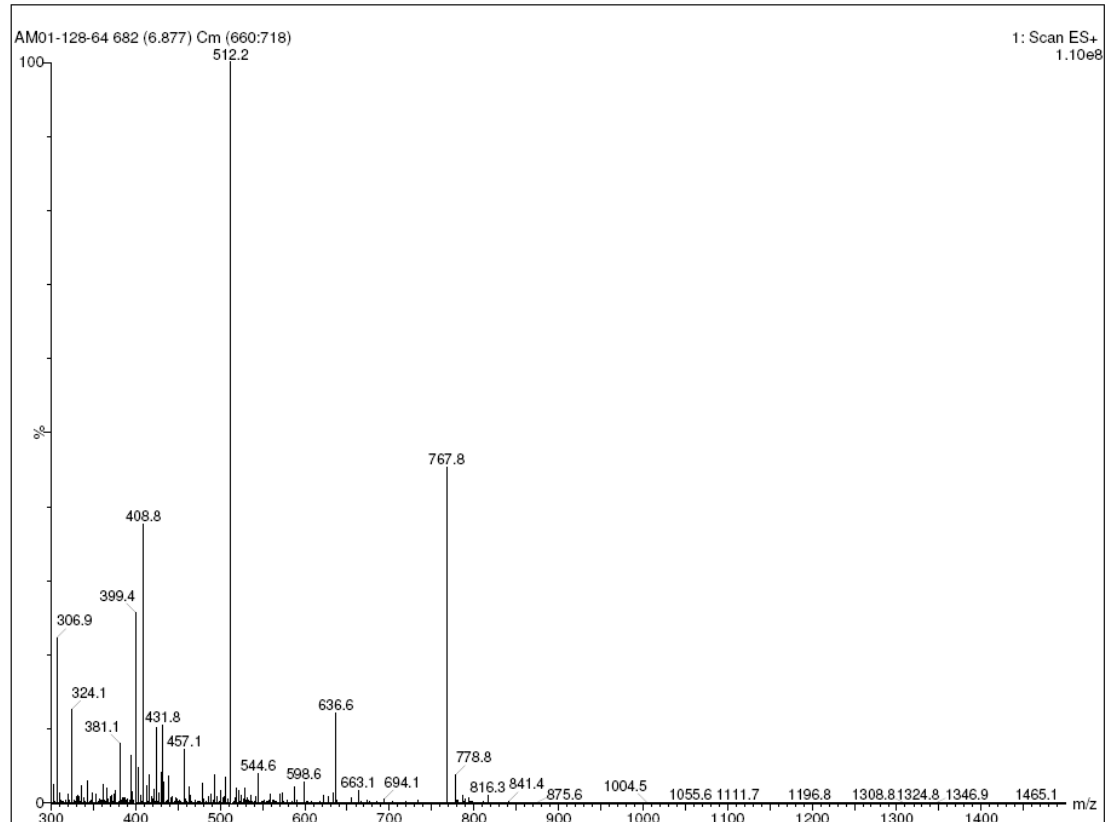
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

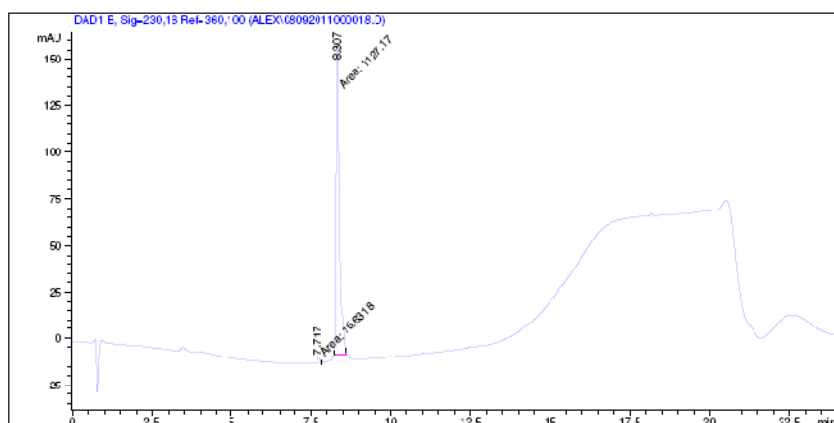
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.632	MM	0.0935	14.02435	2.50062	1.6395
2	8.105	MM	0.0946	16.02561	2.82300	1.8735
3	8.218	MM	0.1175	825.35437	117.11914	96.4870

Totals : 855.40432 122.44277



<Glu-(D)R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F



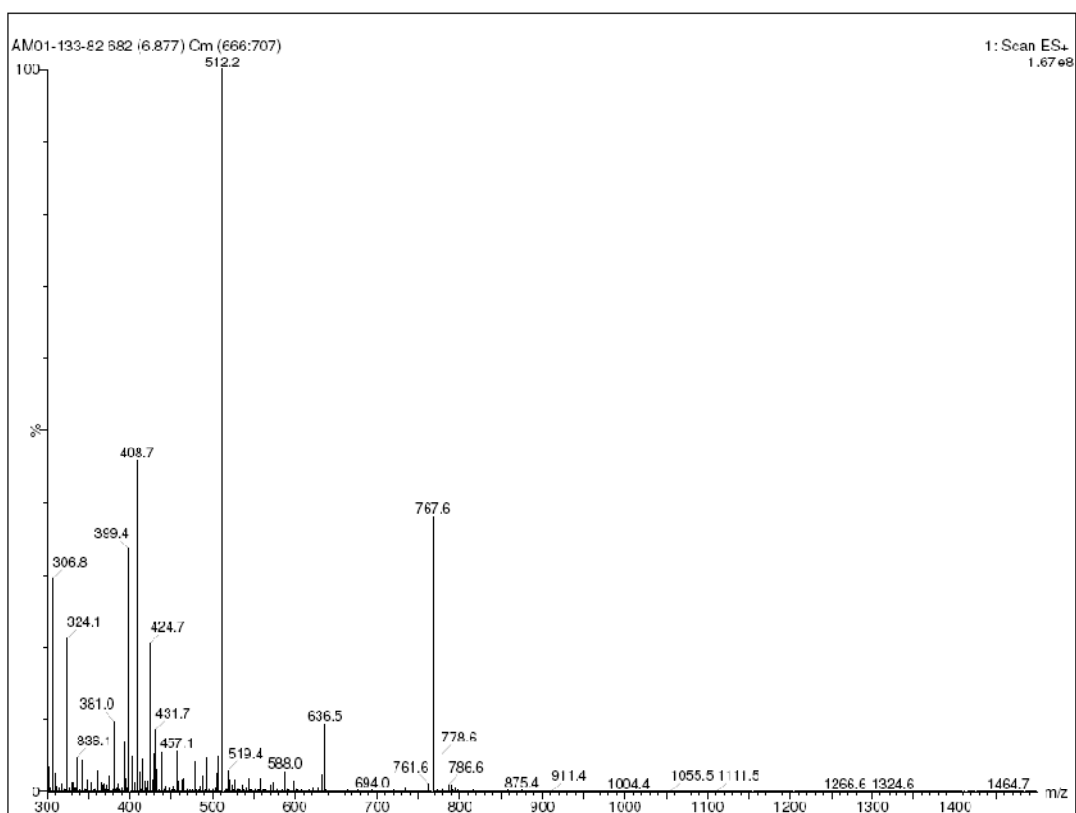
Area Percent Report

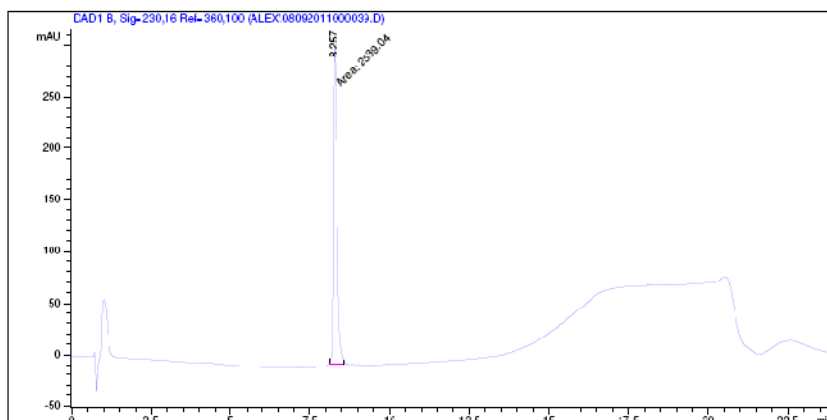
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 E, Sig=230,15 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.717	MM	0.1029	15.63179	2.53193	1.3678
2	8.307	MM	0.1142	164.52380	164.52380	98.6322

Totals : 1142.80586 167.05573



(D)<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-P-F

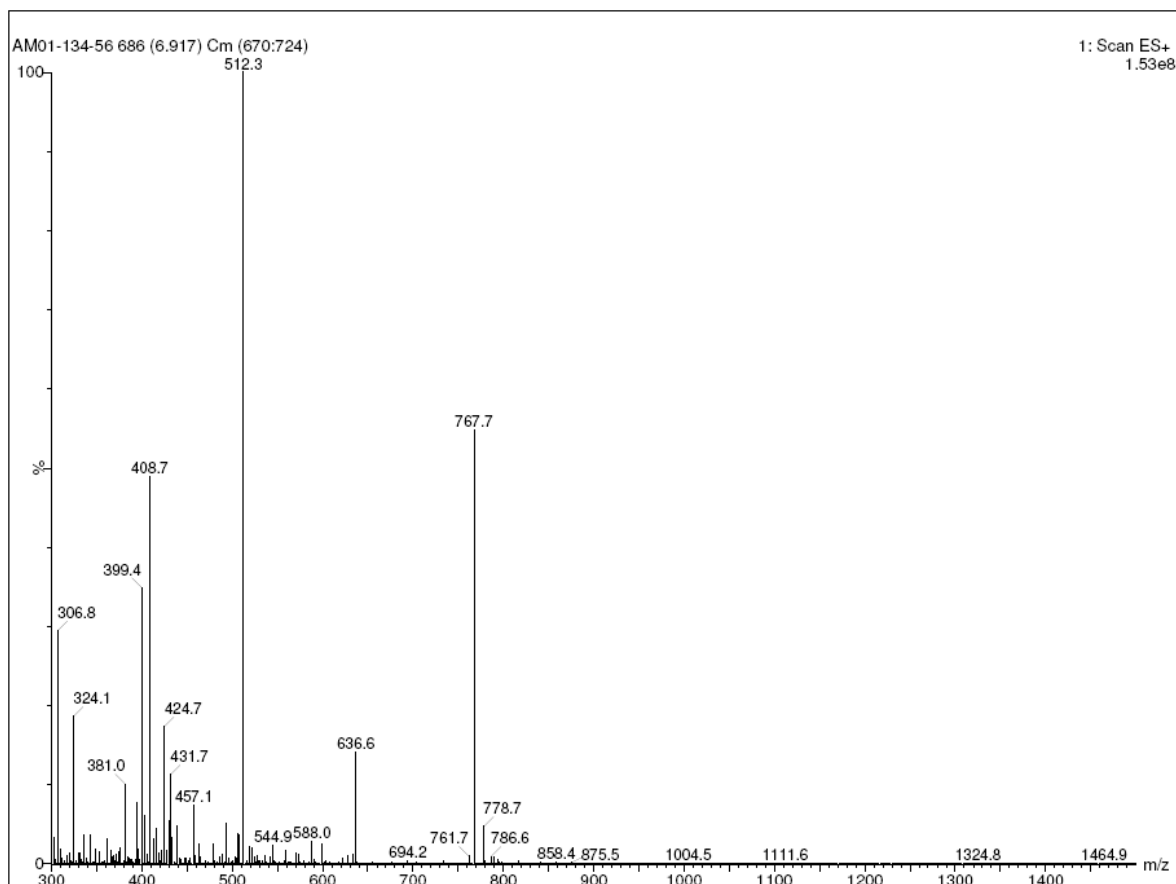
 Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

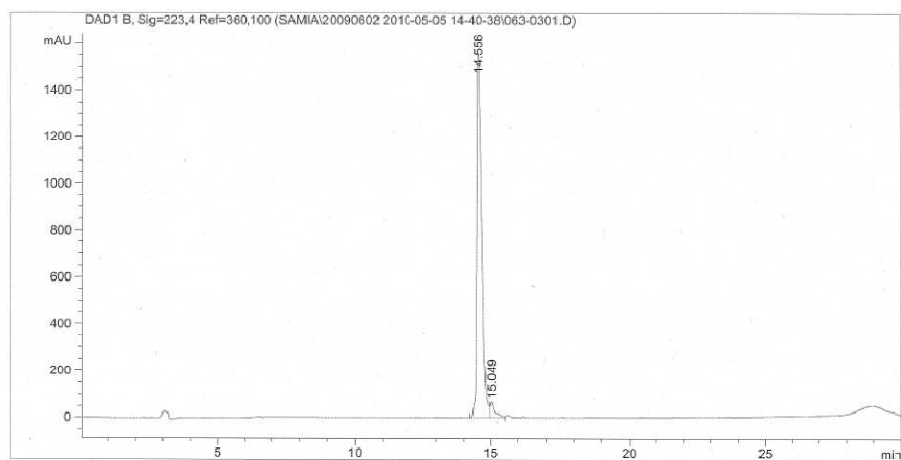
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.257	MM	0.1378	2539.03687	307.07901	100.0000

Totals : 2539.03687 307.07901



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Dip



=====
 Area Percent Report
 =====

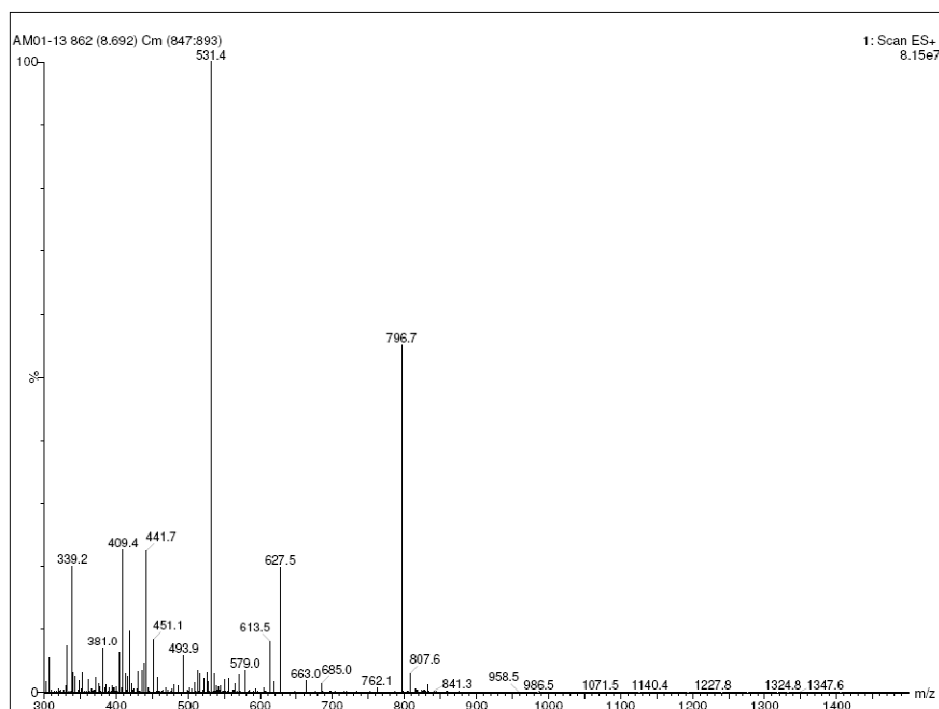
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

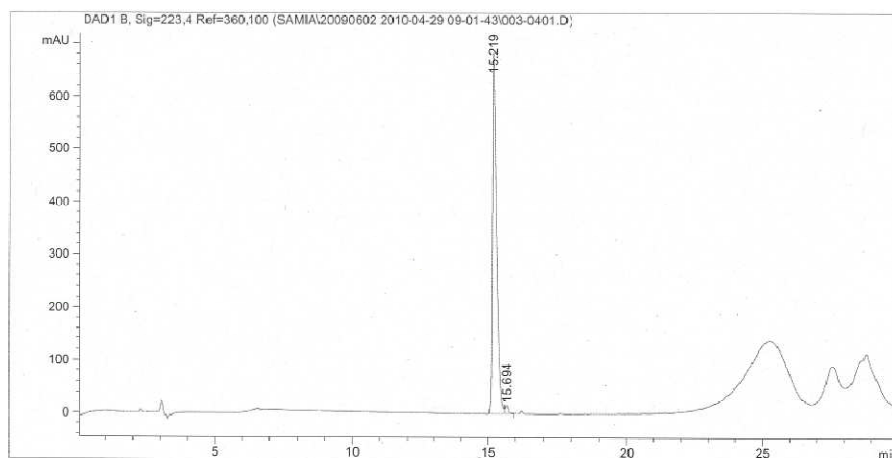
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	14.556	BV	0.1999	2.00854e4	1562.78113	95.5535
2	15.049	VV	0.1825	934.65710	70.56394	4.4465

possible 5 et 6

Totals : 2.10201e4 1633.34507



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bip



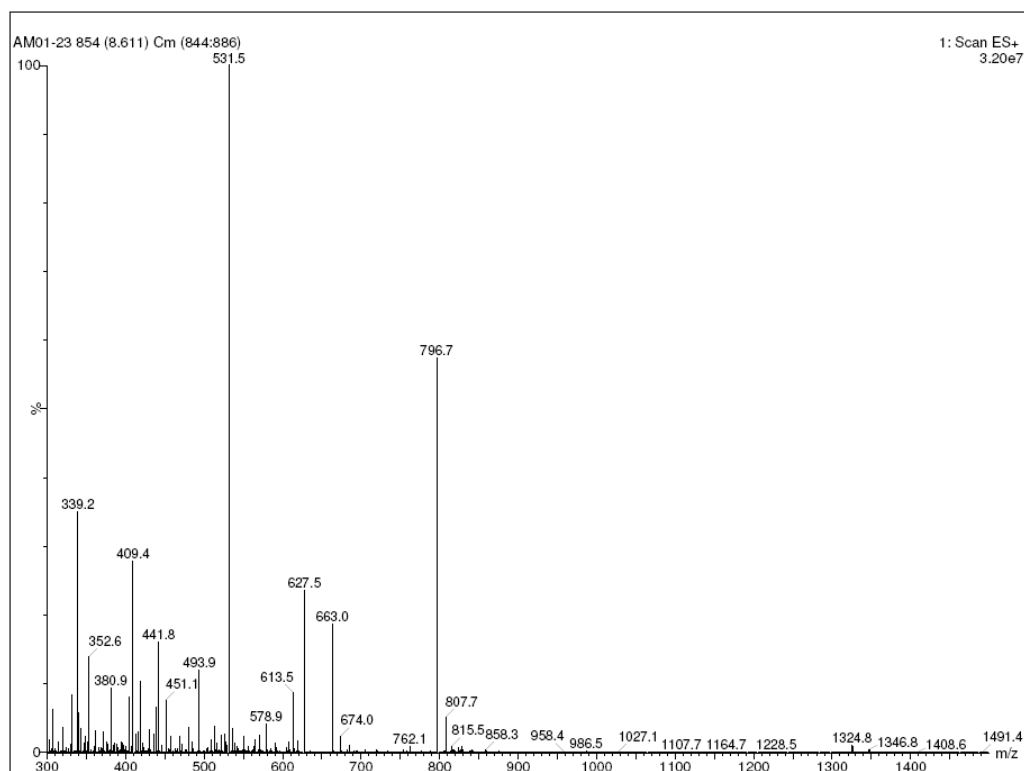
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

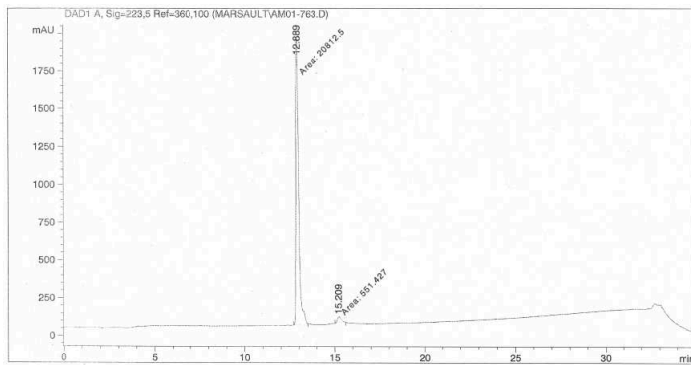
Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	15.219	BV	0.1527	7199.96533	684.57782	98.1829
2	15.694	VB	0.1206	133.25253	16.09519	1.8171

Totals : 7333.21786 700.67301



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-1Nal

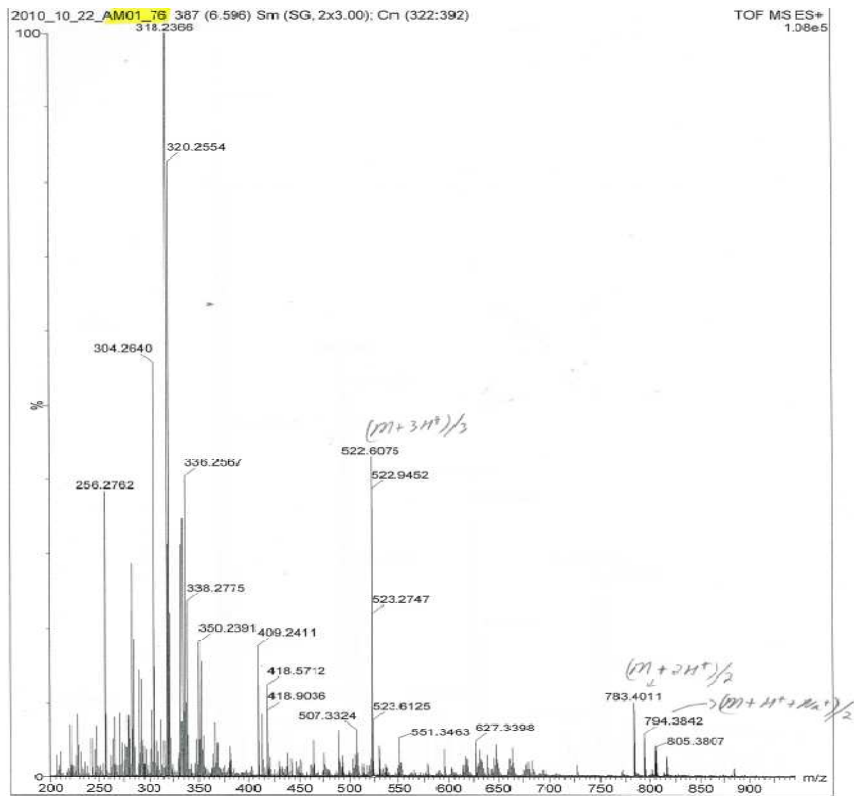


Area Percent Report

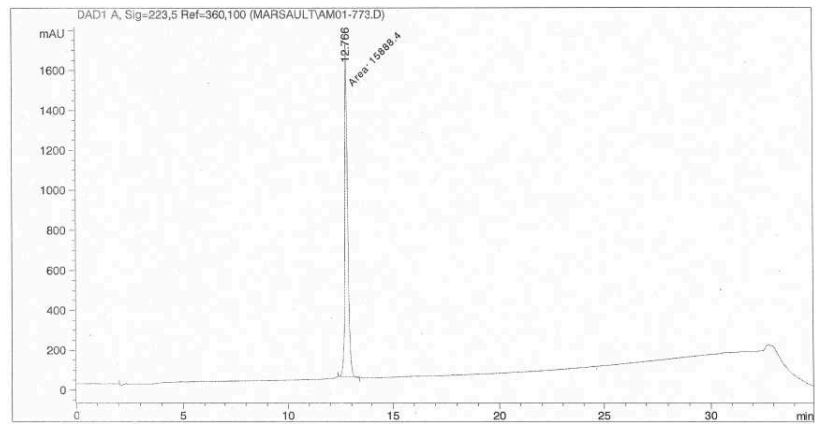
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal : DAD1 A, Sig=223,5 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	12.889	MM	0.1836	2.08125e4	1889.67834	97.4189
2	15.209	MM	0.2326	551.42670	39.50610	2.5811
Totals :				2.13639e4	1929.18444	



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-2Nal



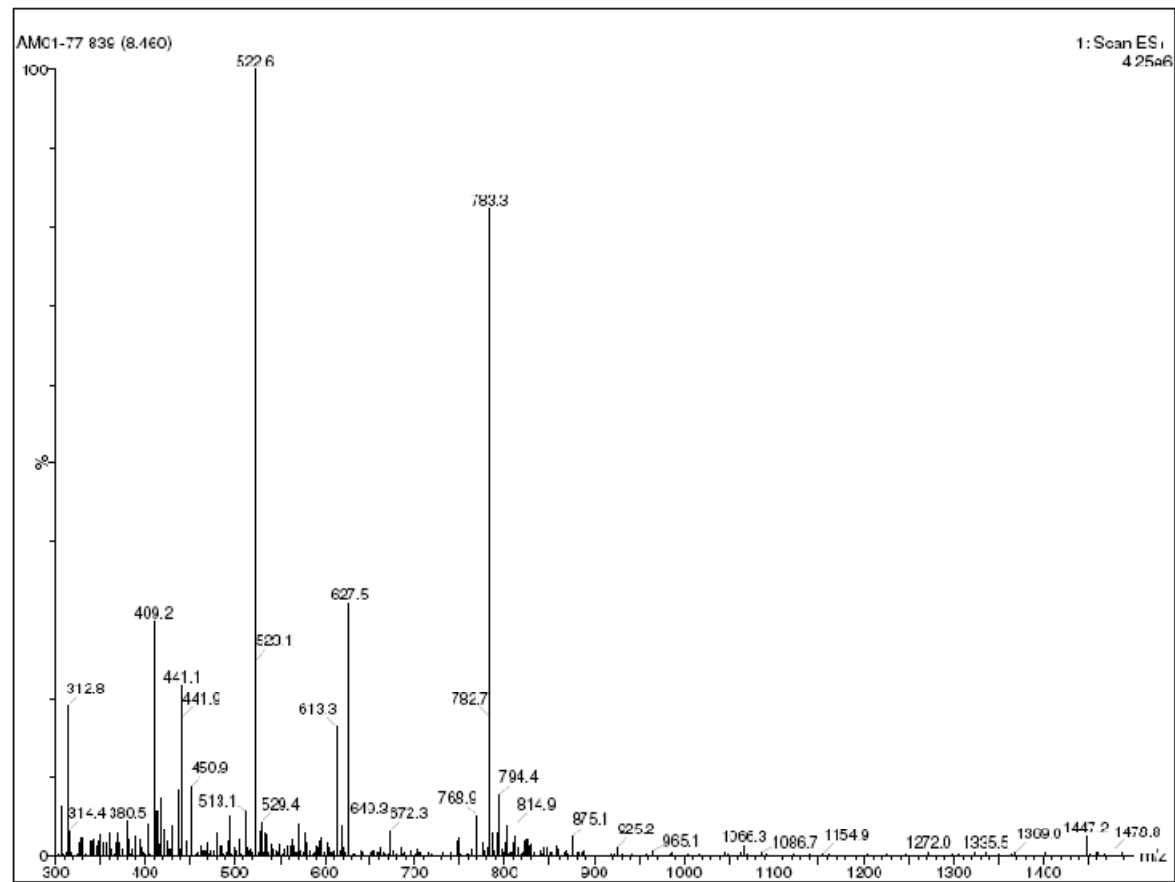
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

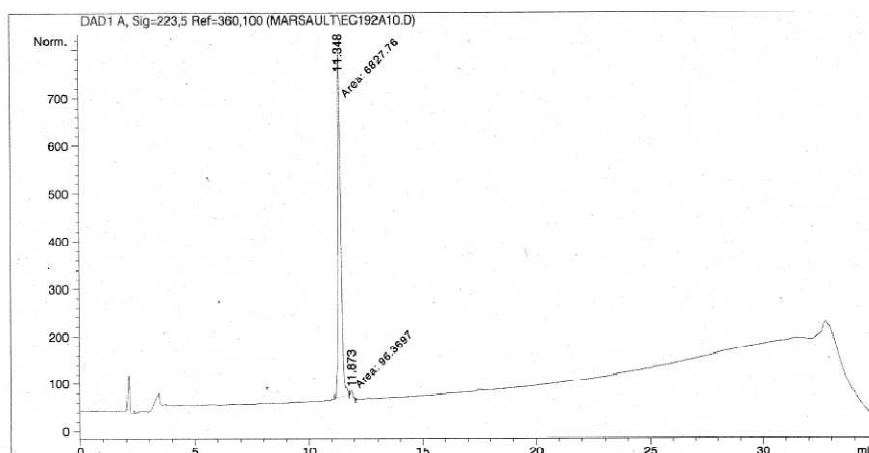
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,5 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	12.766	MM	0.1590	1.58884e4	1665.15369	100.0000

Totals : 1.58884e4 1665.15369



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Cha



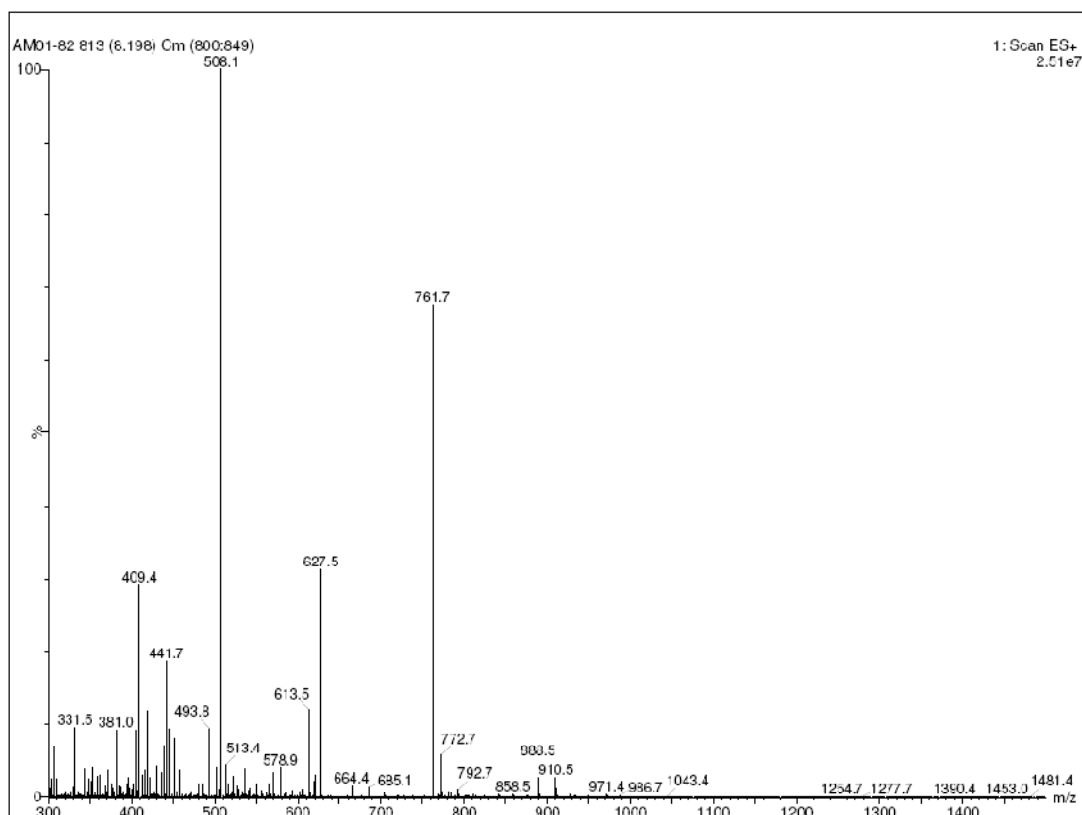
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

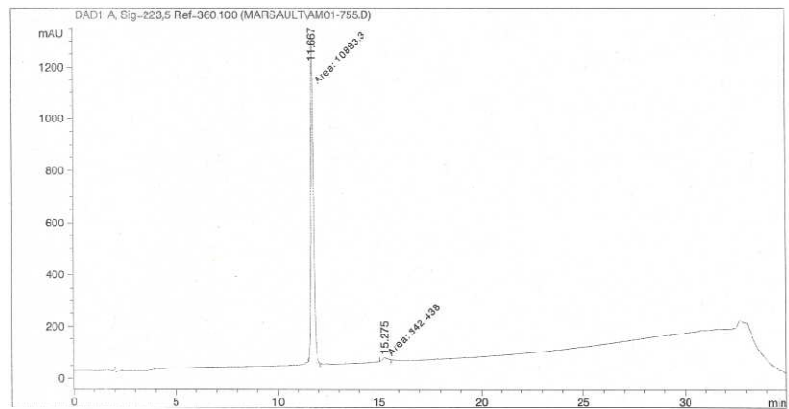
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,5 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.348	MM	0.1572	6827.75684	723.76001	98.6082
2	11.873	MM	0.1311	96.36967	12.25262	1.3918

Totals : 6924.12651 736.01263



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-W



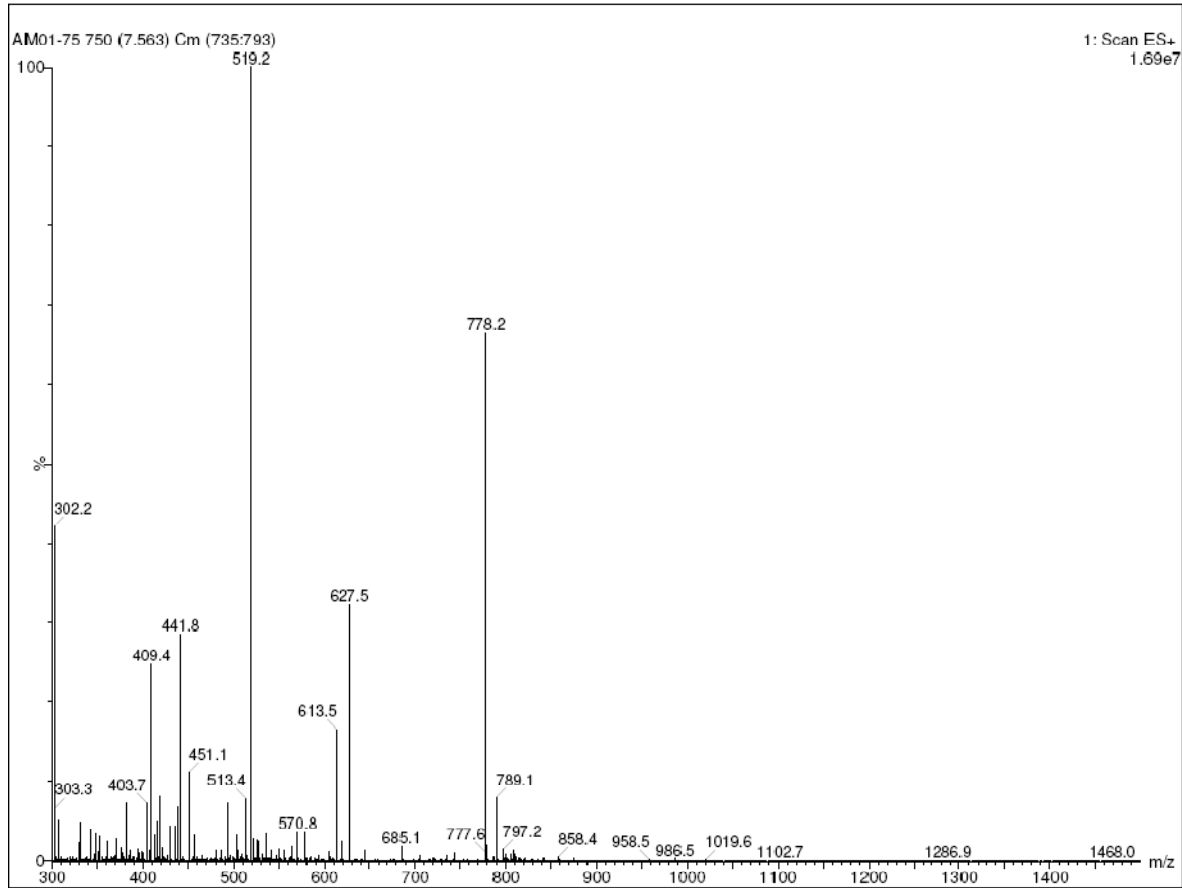
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

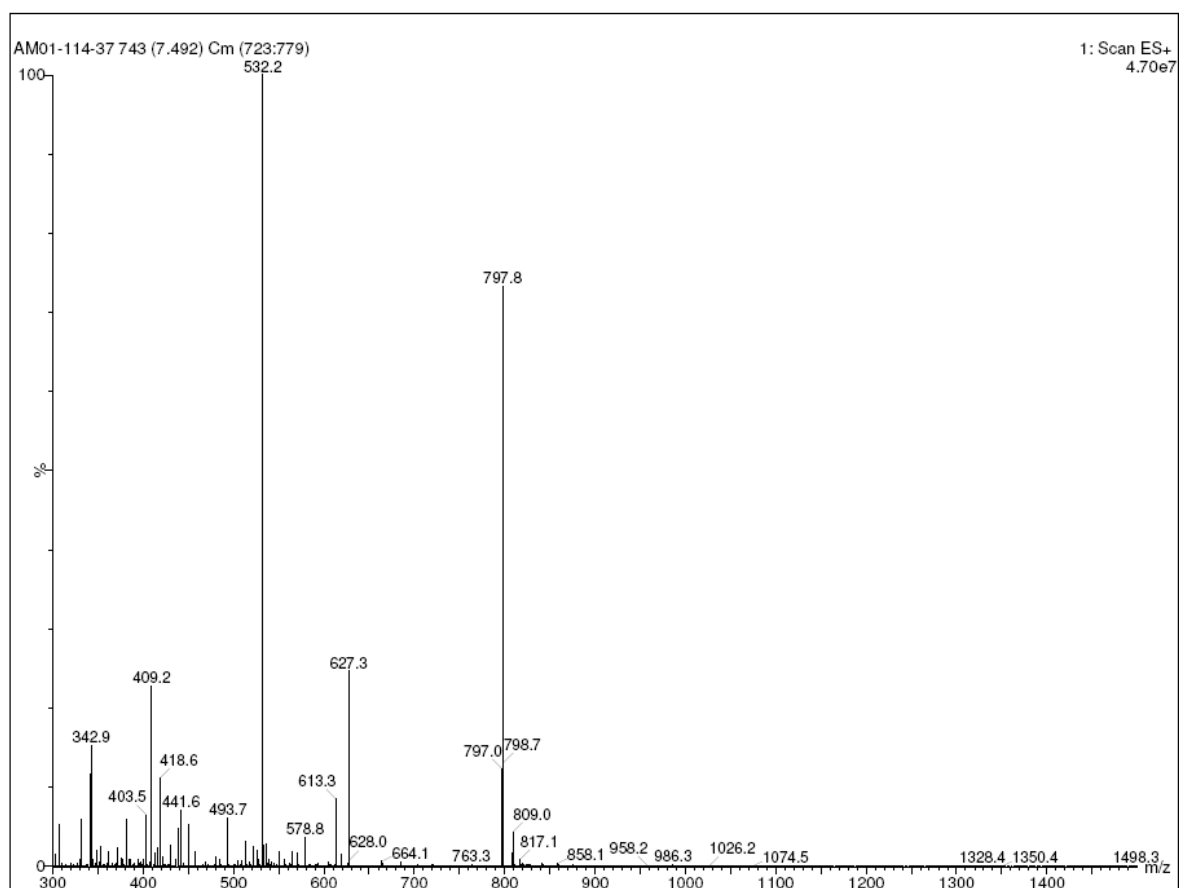
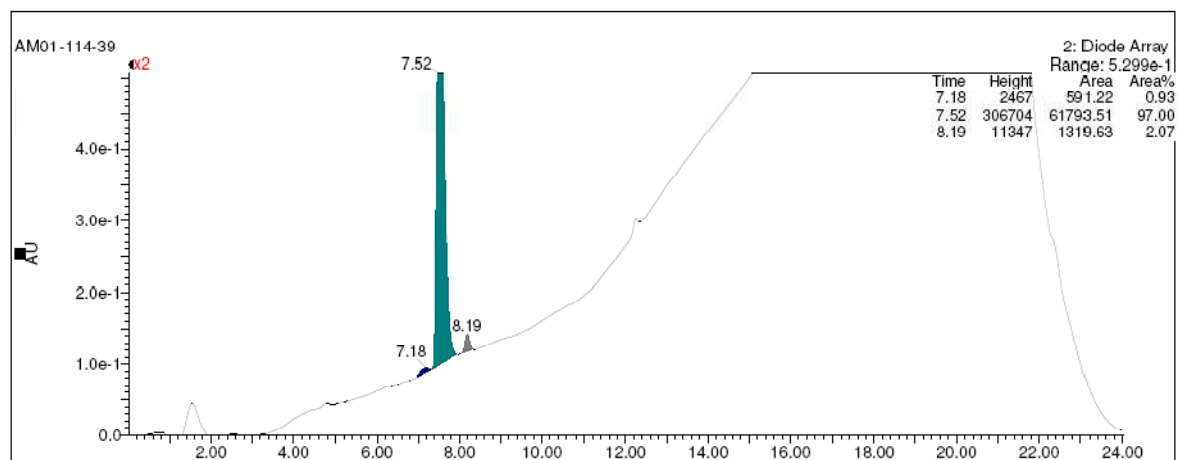
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,5 Ref=360.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.667	MM	0.1478	1.08933e4	1228.57104	96.9522
2	15.275	MM	0.3686	342.43768	15.48189	3.0478

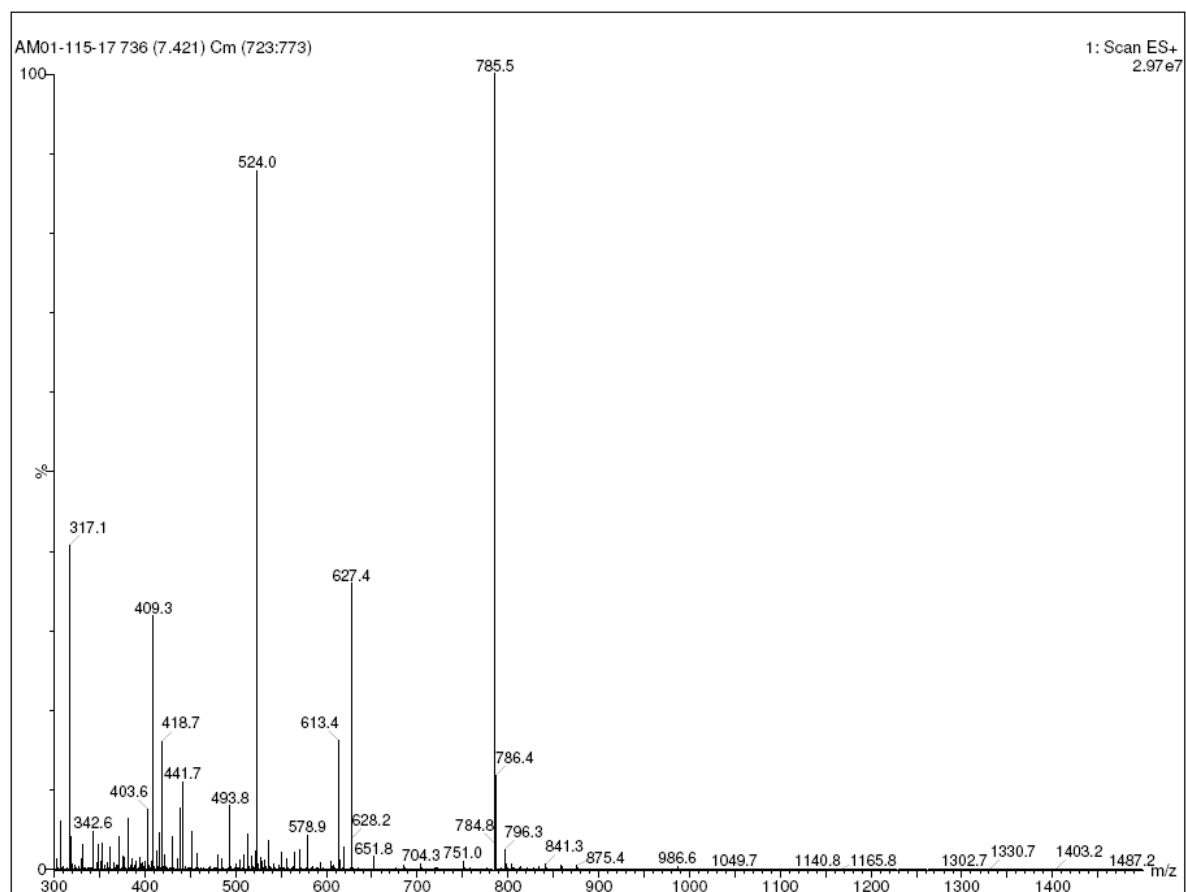
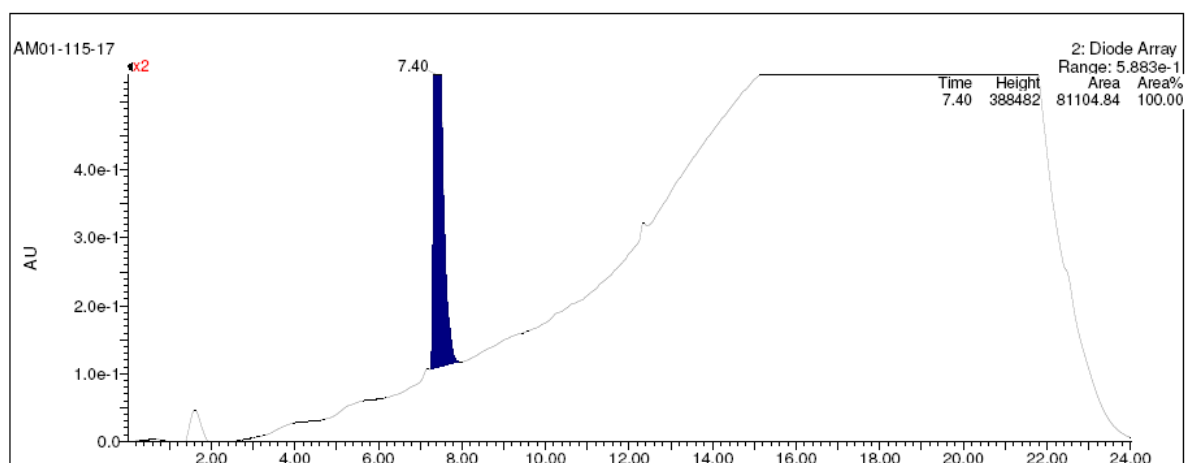
Totals : 1.12357e4 1244.05293



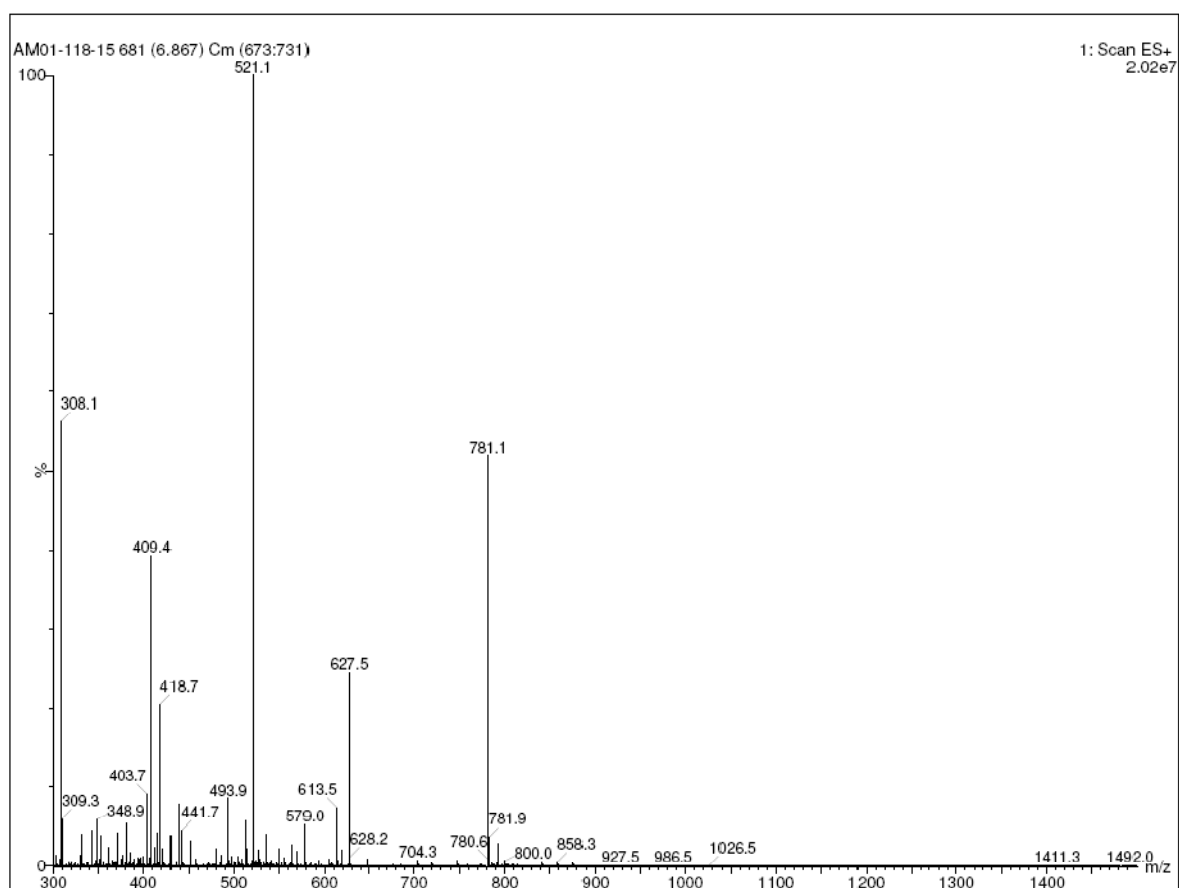
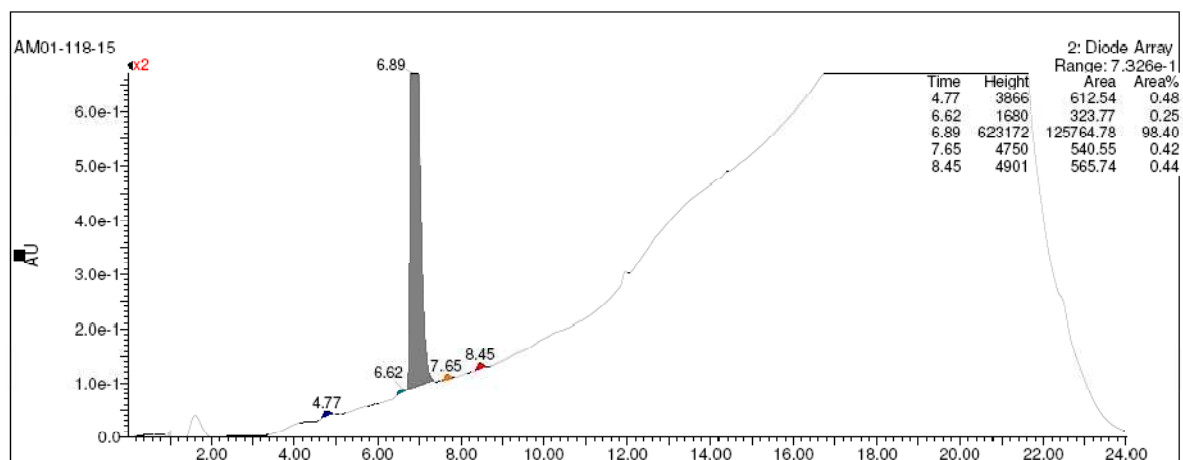
<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-Br)F



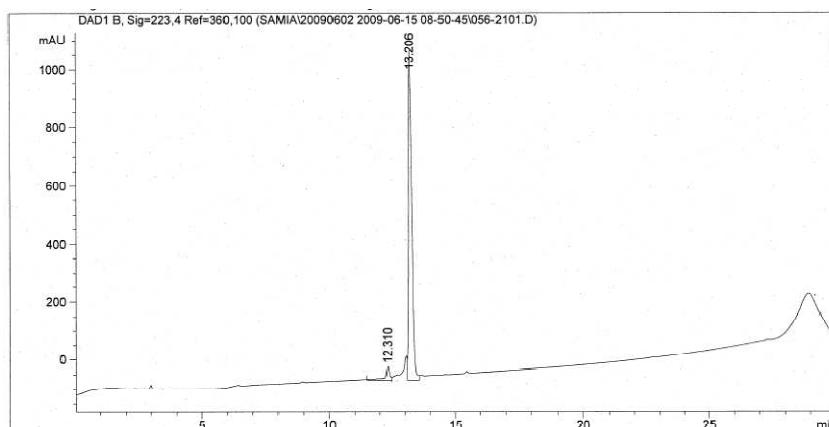
<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(2,4,5-trifluoro)F



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-nitro)F



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-N_Me_Ala-F



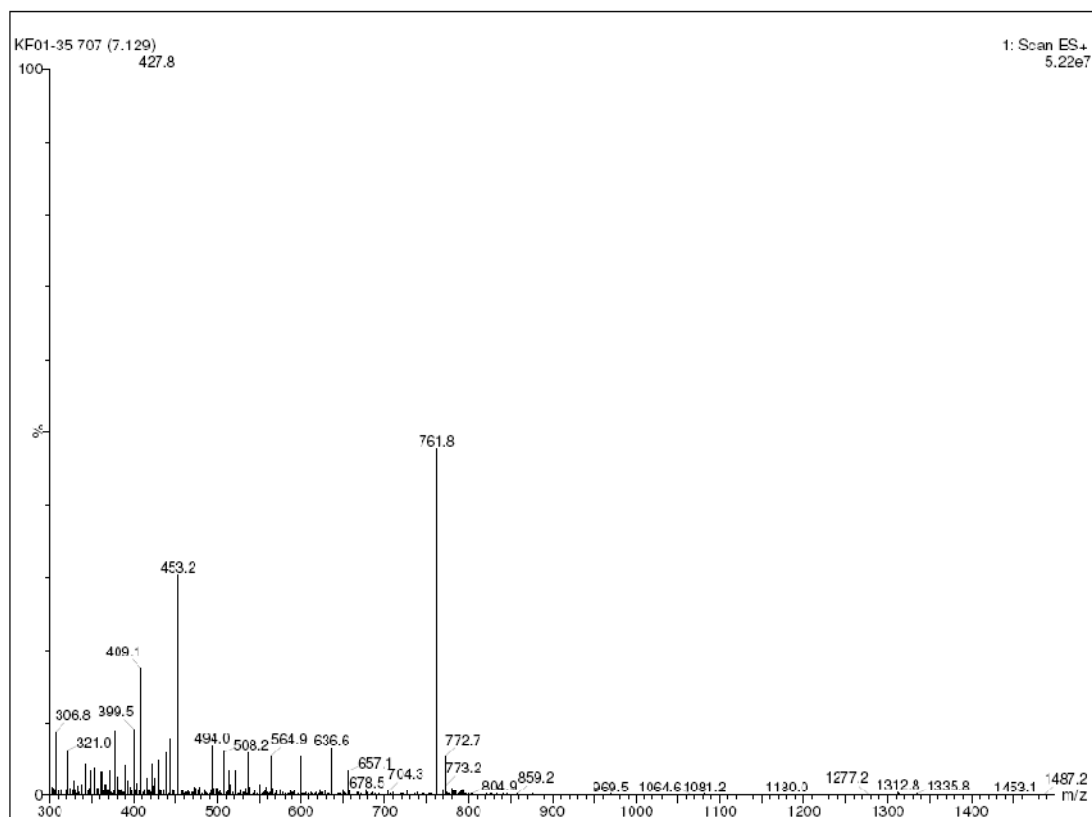
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

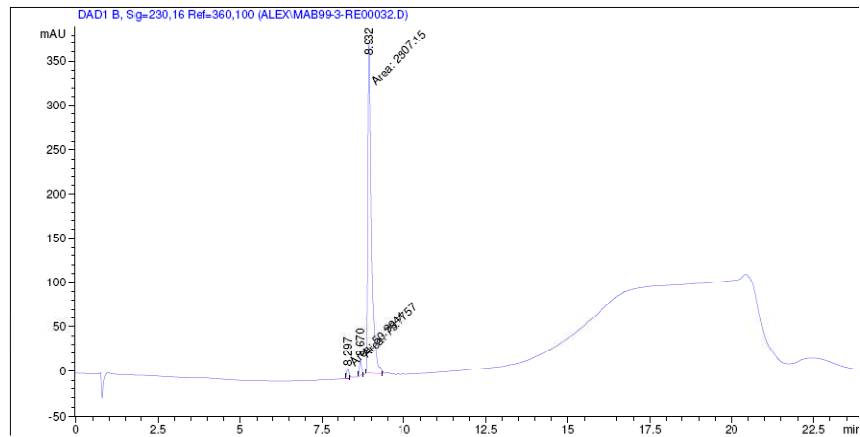
Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	12.310	BV	0.1628	528.89124	44.46510	4.9001
2	13.206	VV	0.1416	1.02645e4	1134.41870	95.0999

Totals : 1.07934e4 1178.88380



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-Aib-F



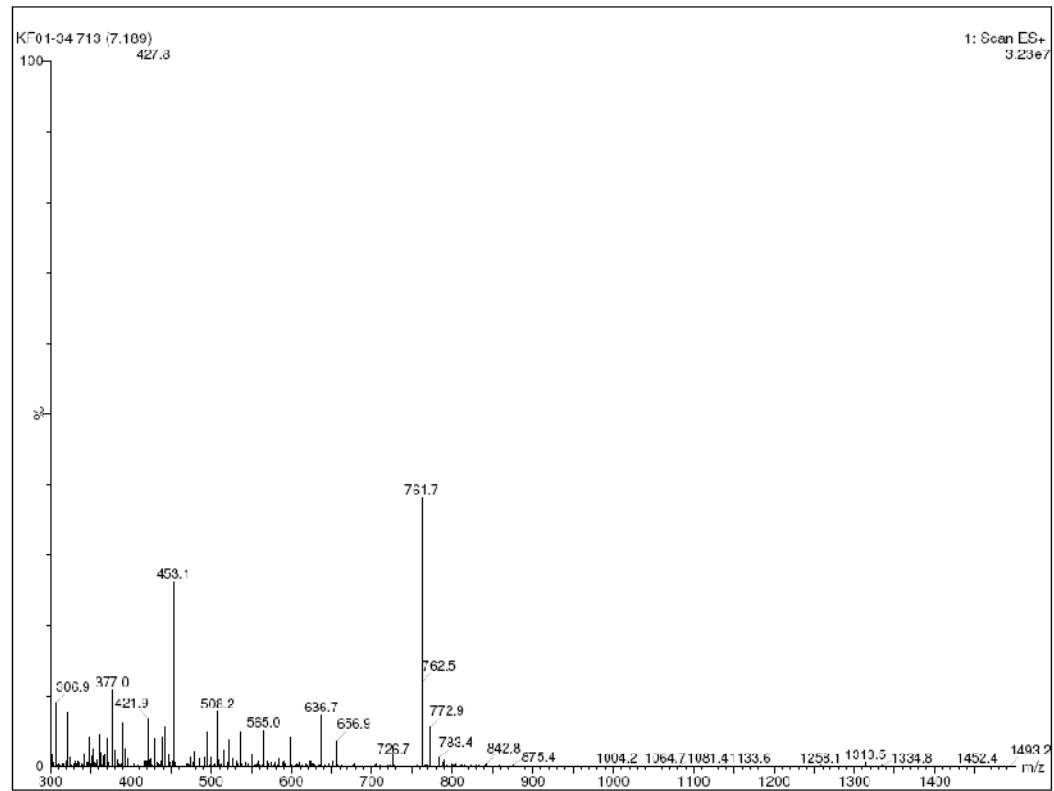
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

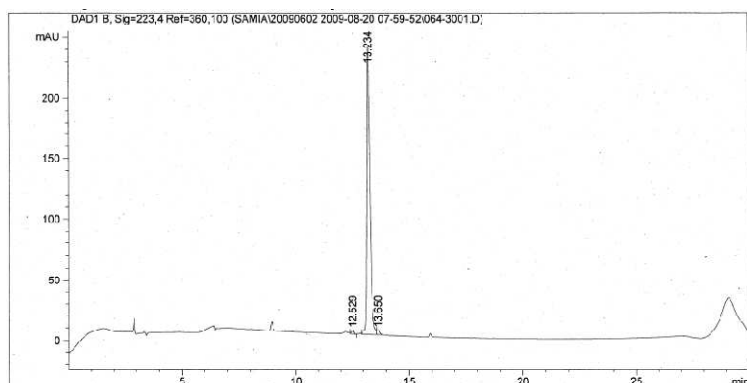
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.297	MM	0.0774	50.99414	10.98132	1.7381
2	8.670	MM	0.0710	75.77571	17.77648	2.5827
3	8.932	MM	0.1261	2807.15063	371.10703	95.6792

Totals : 2833.92049 399.86482



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-M-HoPro-F



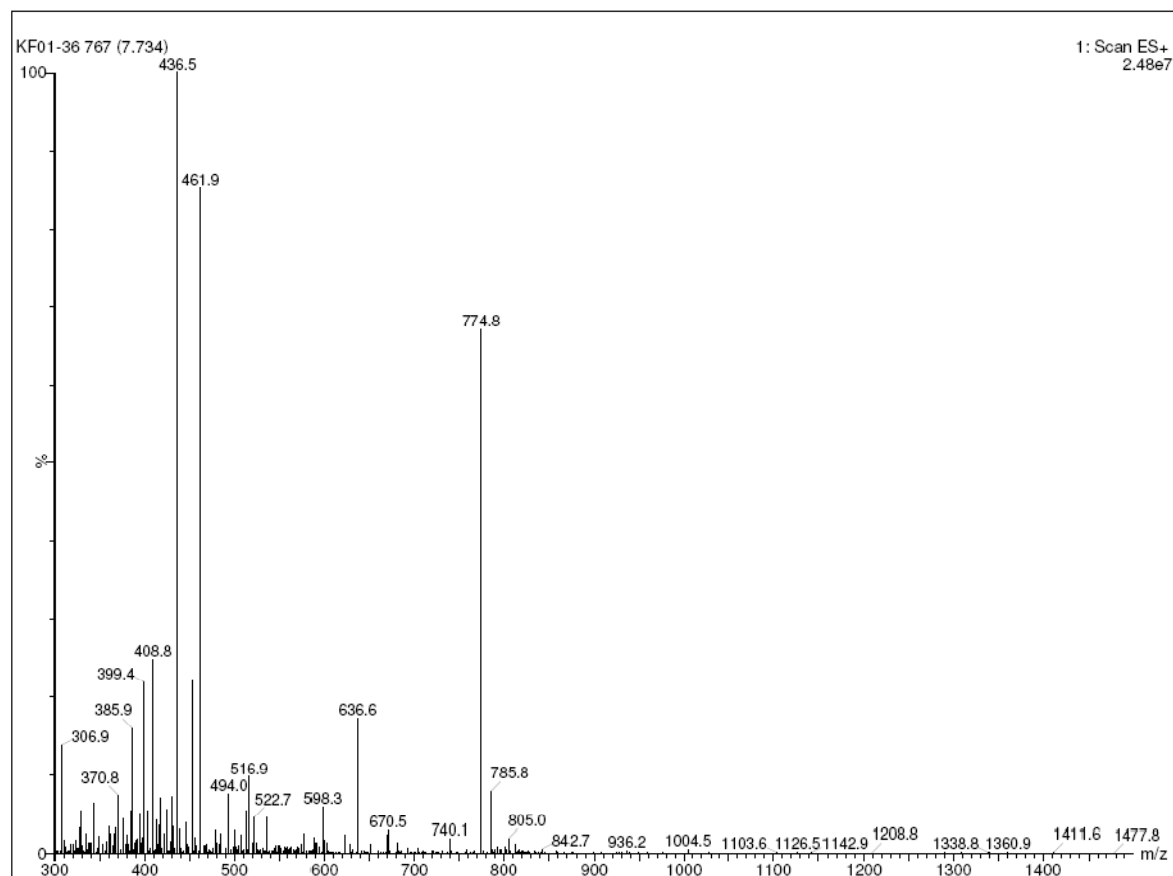
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

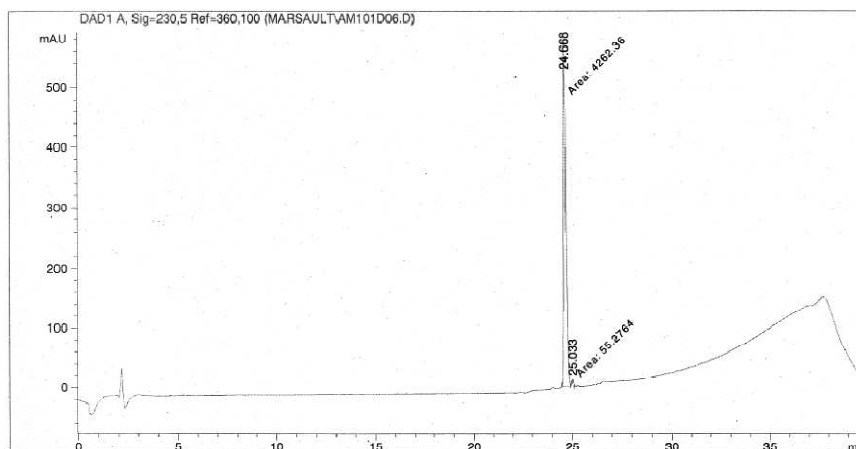
Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	12.529	VV	0.1179	22.40415	2.84311	1.0064
2	13.234	BV	0.1368	2176.09570	237.72339	97.7488
3	13.650	VB	0.1100	27.71204	3.67305	1.2448

Totals : 2226.21189 244.23955



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Acpc-F



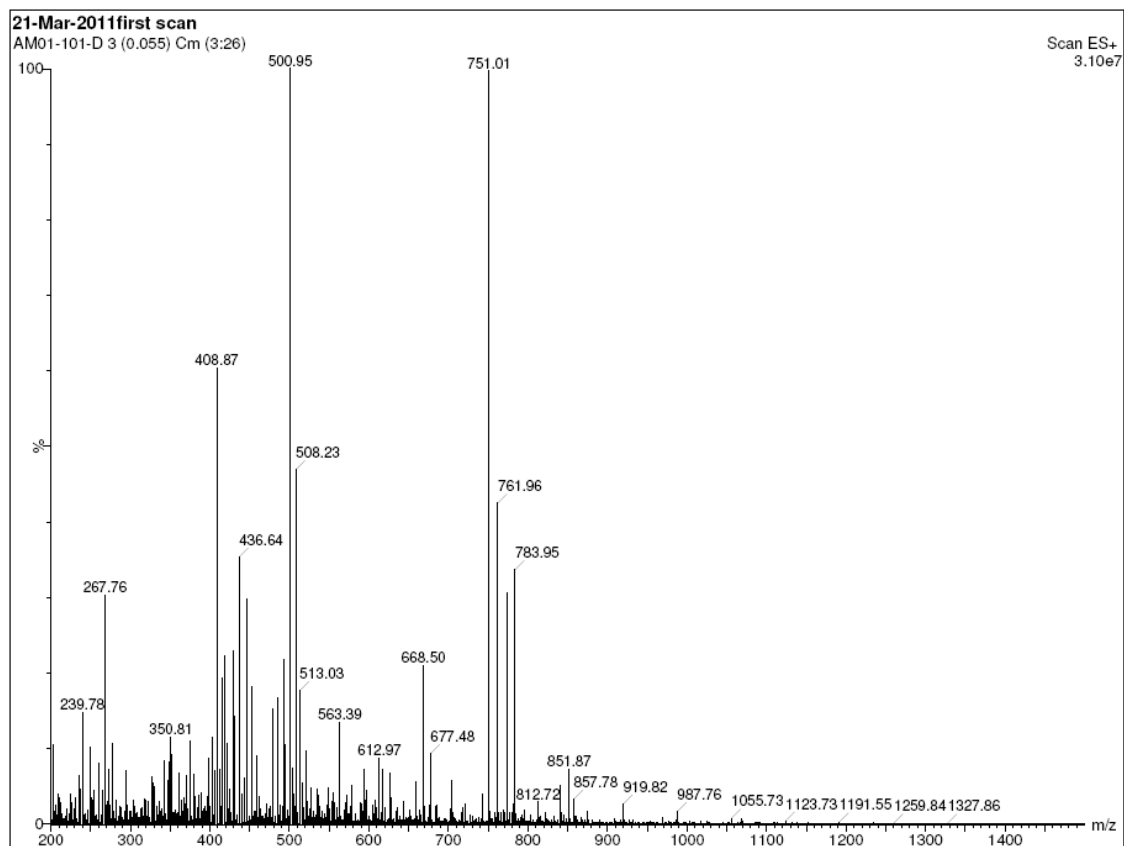
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

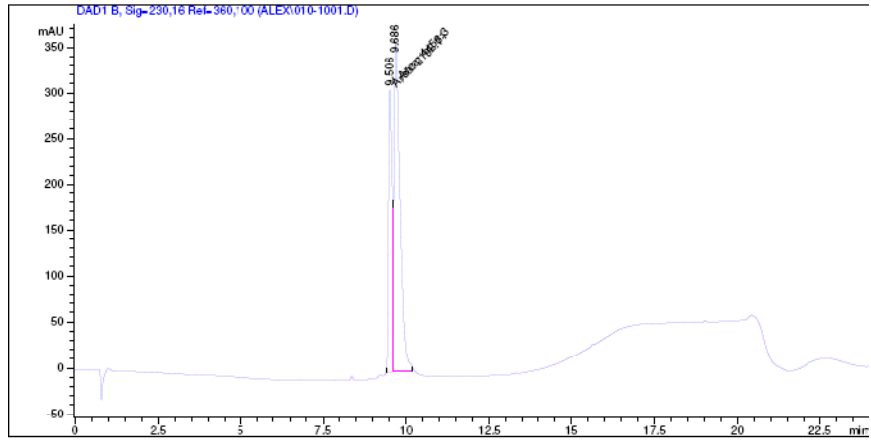
Signal 1: DAD1 A, Sig=230,5 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	24.668	MM	0.1253	4262.35645	566.88568	98.7198
2	25.033	MM	0.0805	55.27644	11.44282	1.2802

Totals : 4317.63288 578.32850



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aminoindane-F



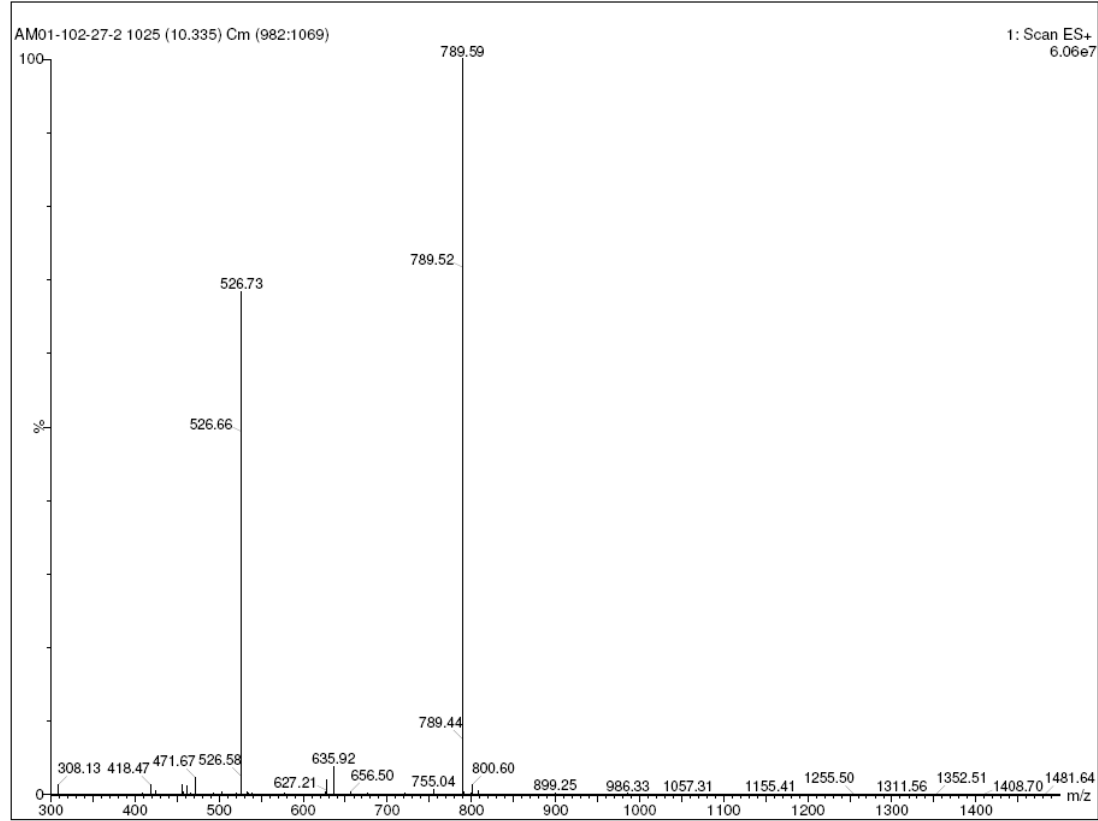
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

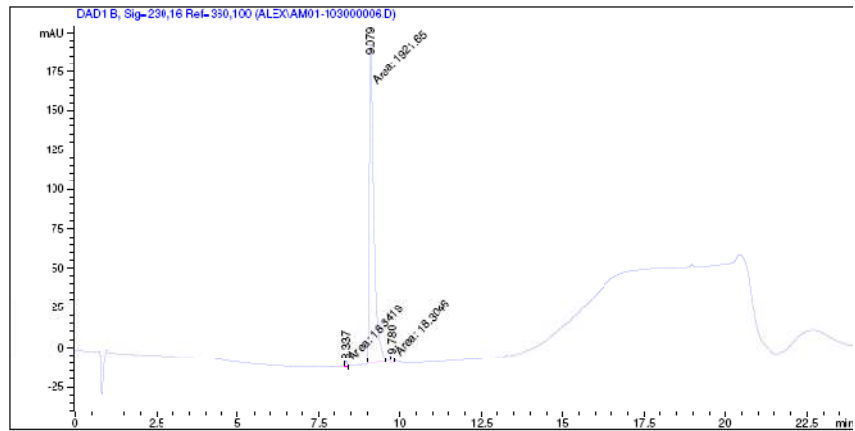
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.506	MM	0.1185	2192.71069	308.41696	32.9780
2	9.686	MM	0.2073	4456.30225	358.20291	67.0220

Totals : 6649.01294 666.61987



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-cycloleucine-F



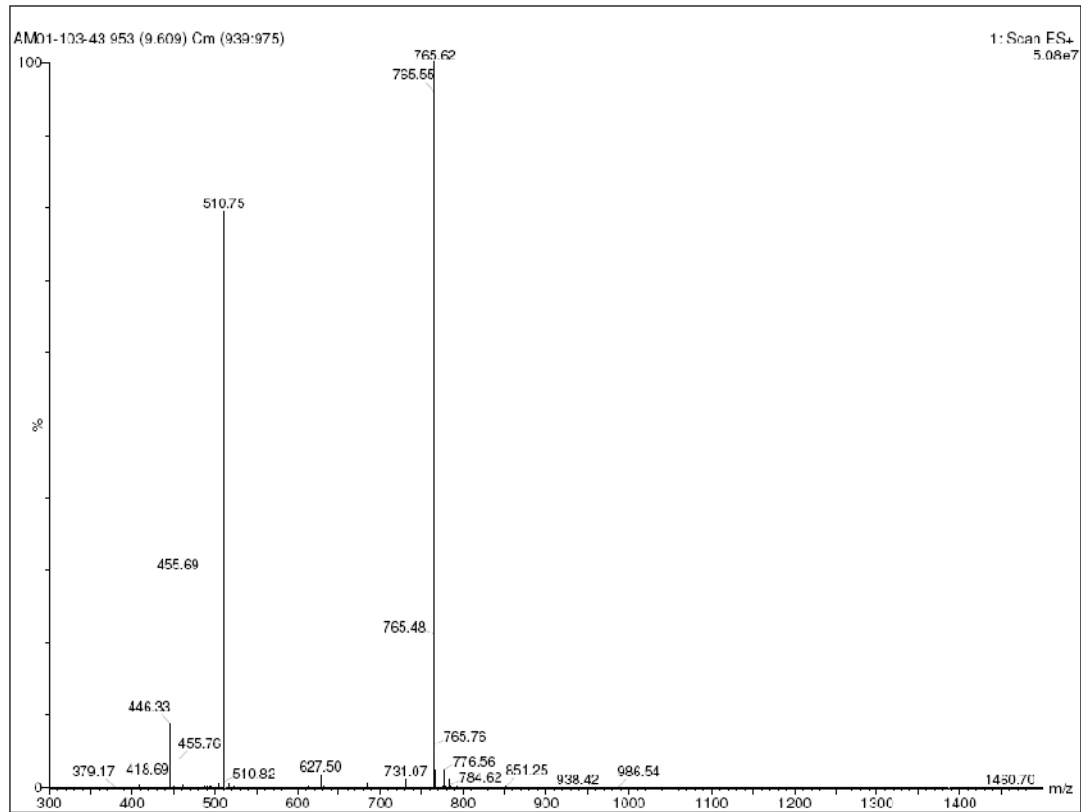
Area Percent Report:

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

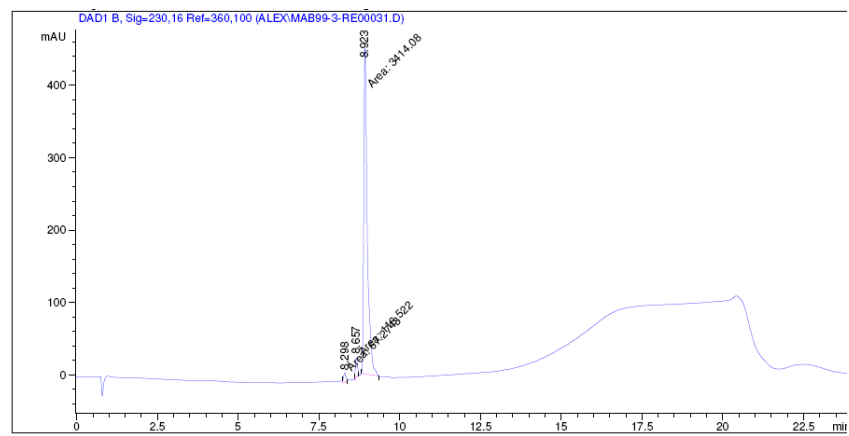
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.337	MM	0.0839	18.34186	3.64325	0.9366
2	9.079	MM	0.1577	1921.65051	203.09770	98.1287
3	9.789	MM	0.0811	18.30457	3.75330	0.9347

Totals : 1958.29695 210.50424



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-F



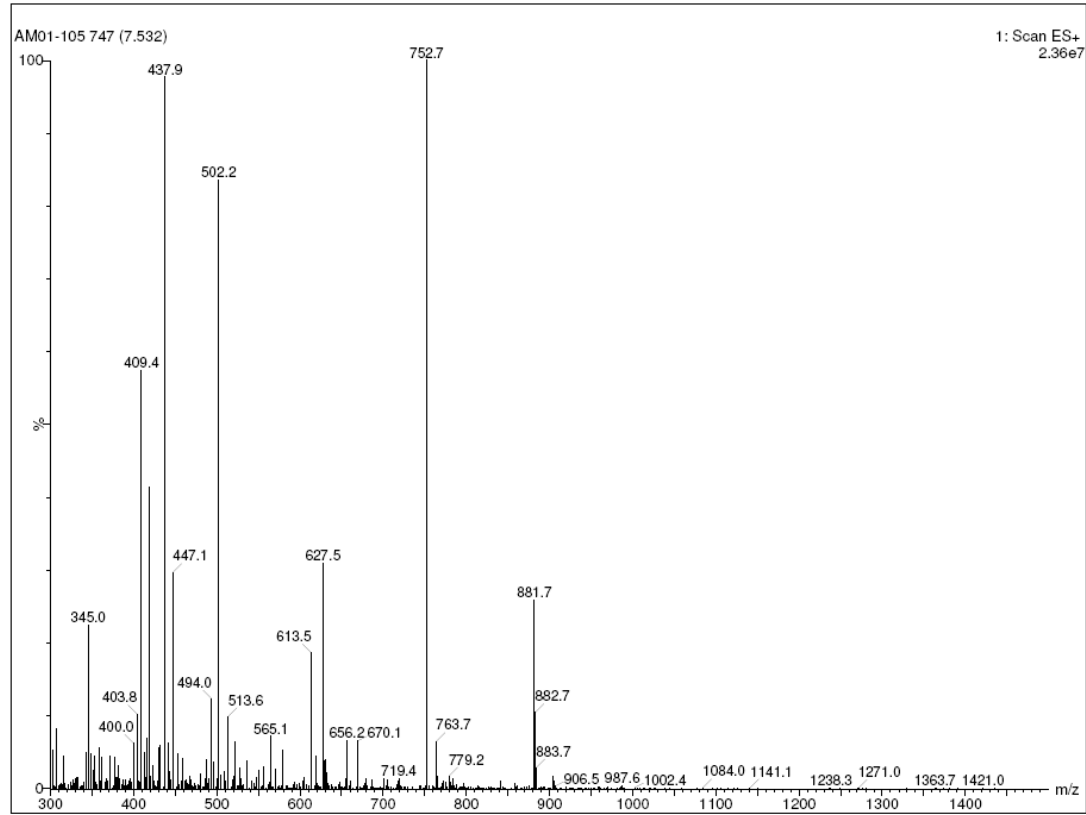
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

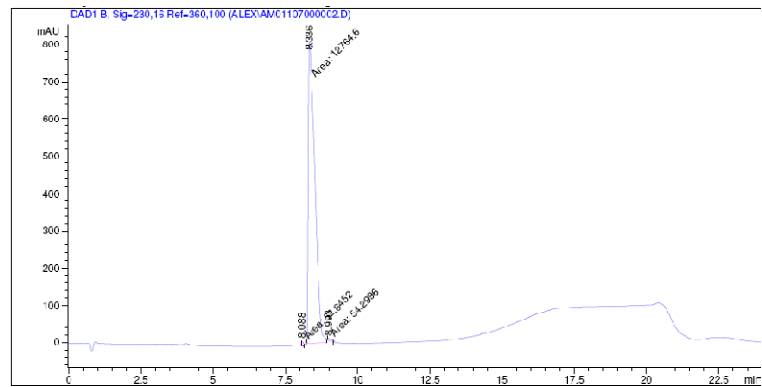
Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.298	MM	0.0889	67.27428	12.61551	1.8698
2	8.657	MM	0.0699	116.52225	27.76733	3.2386
3	8.923	MM	0.1261	3414.07837	451.25867	94.8915

Totals : 3597.87491 491.64151



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Inp-F



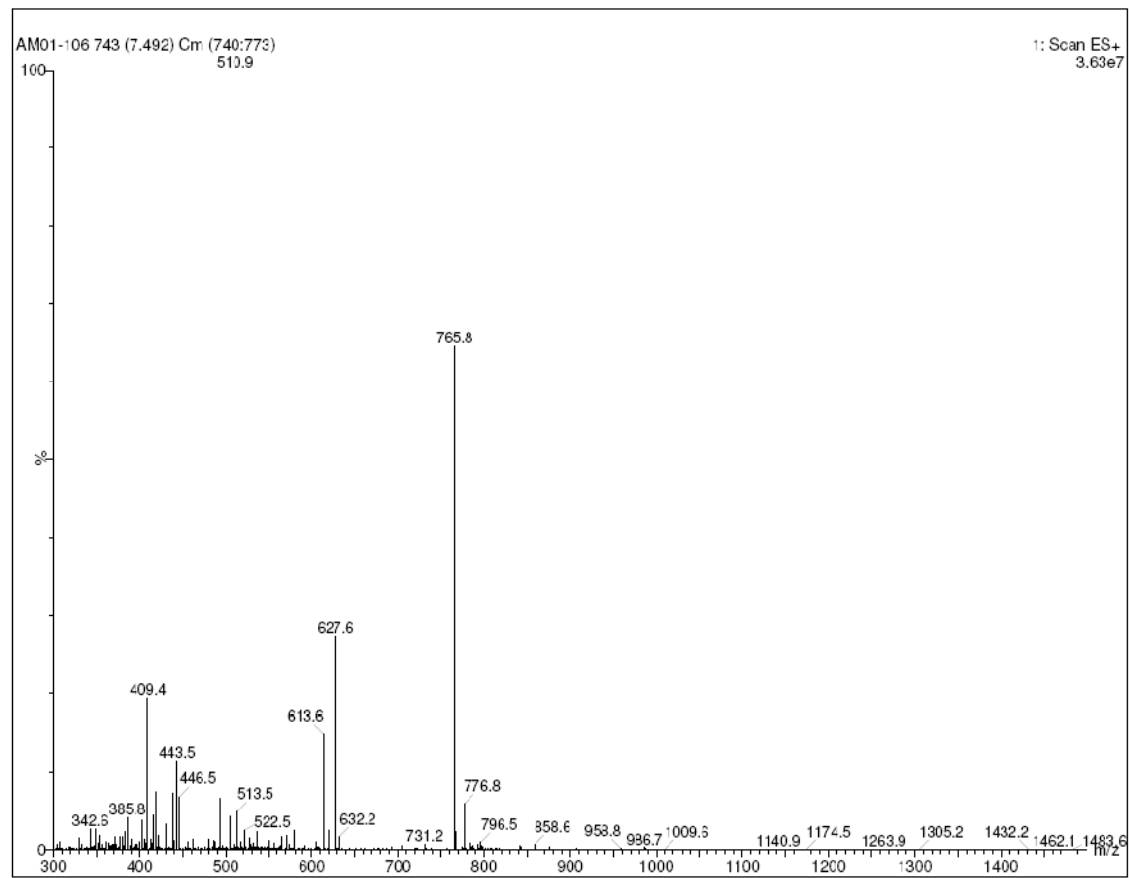
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with TSTDs

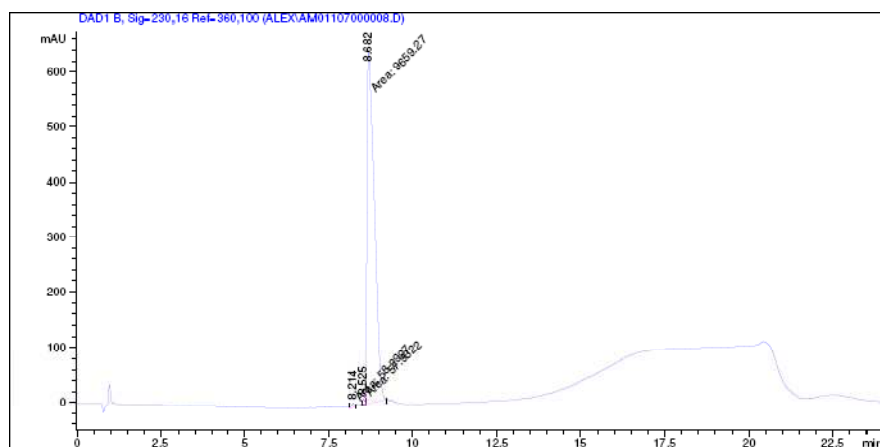
Signal 1: CAD1 B, Sig-230,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.090	NM	0.0723	52.04520	12.17575	0.4106
2	8.336	NM	0.2677	127646.4	812.44287	99.1676
3	8.993	NM	0.1375	54.29963	6.58254	0.4219

Totals : 1.28717e4 831.70116



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-F



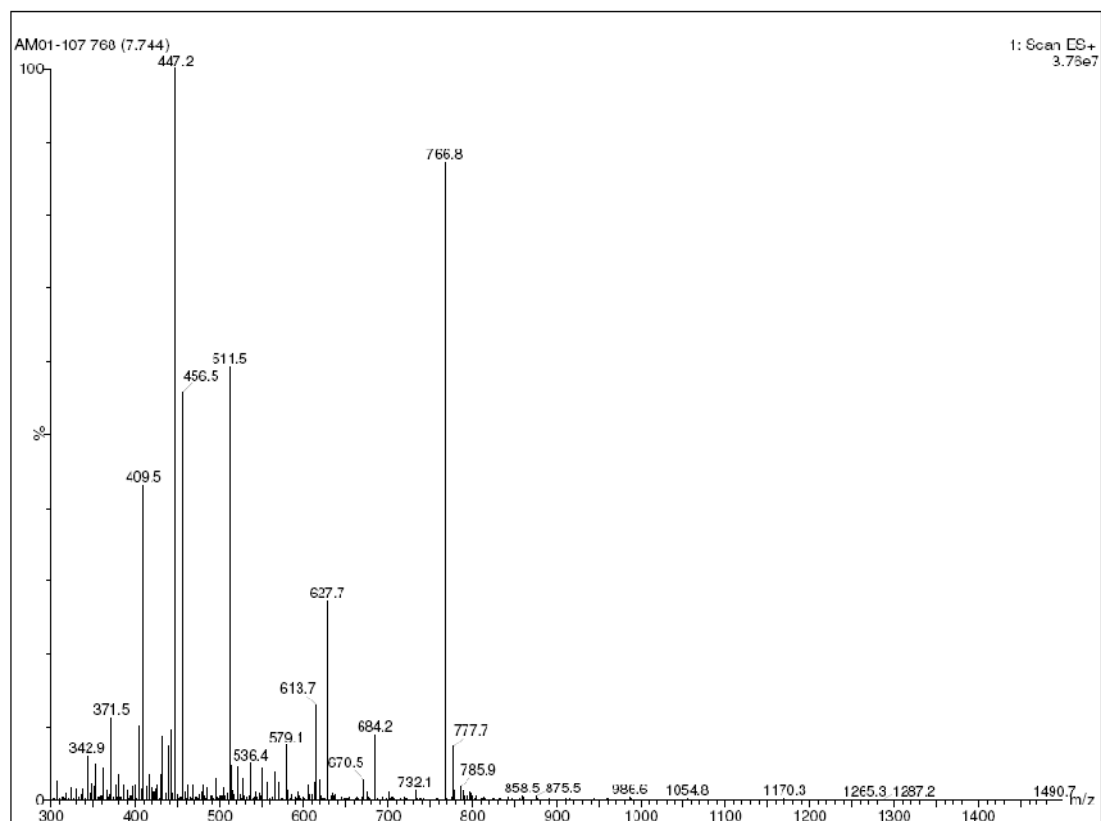
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

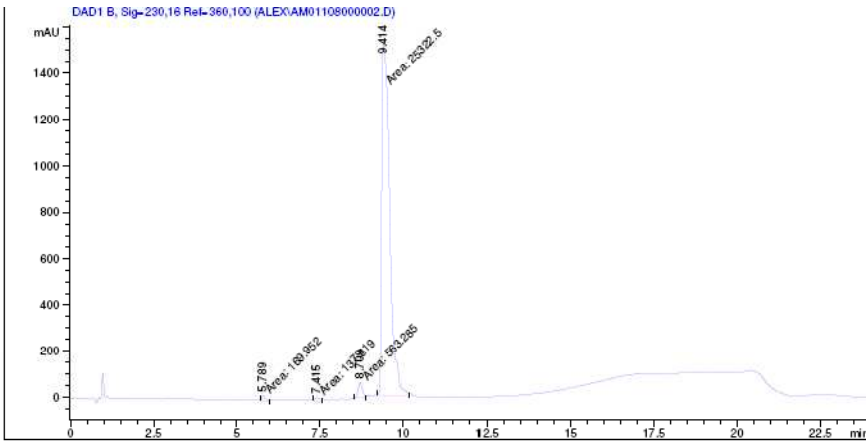
Signal 1: DAD1 B, Sig-230,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.214	MM	0.1236	58.29268	7.85794	0.5963
2	8.525	MM	0.0847	57.93222	11.39968	0.5926
3	8.682	MM	0.2505	9659.27051	642.59479	98.8111

Totals : 9775.49541 661.85241



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-2Nal

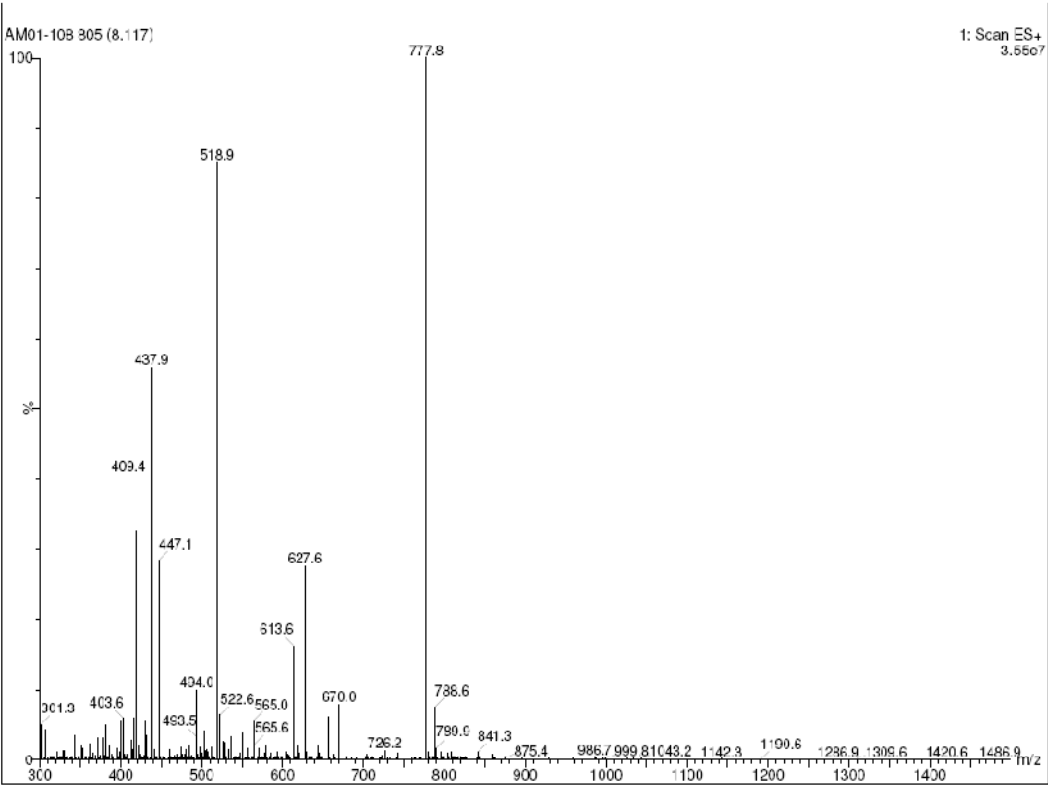


Area Percent Report

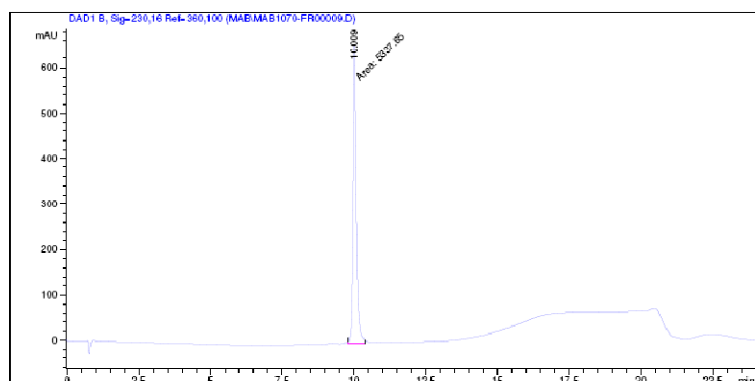
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig-230,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.789	MM	0.1248	169.95236	22.69528	0.6488
2	7.415	MM	0.1604	137.81912	14.31691	0.5262
3	8.709	MM	0.1465	563.28540	64.06651	2.1505
4	9.414	MM	0.2779	2.53225e4	1518.51892	96.6749
Totals :				2.61935e4	1619.59762	



Ac-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-2Nal



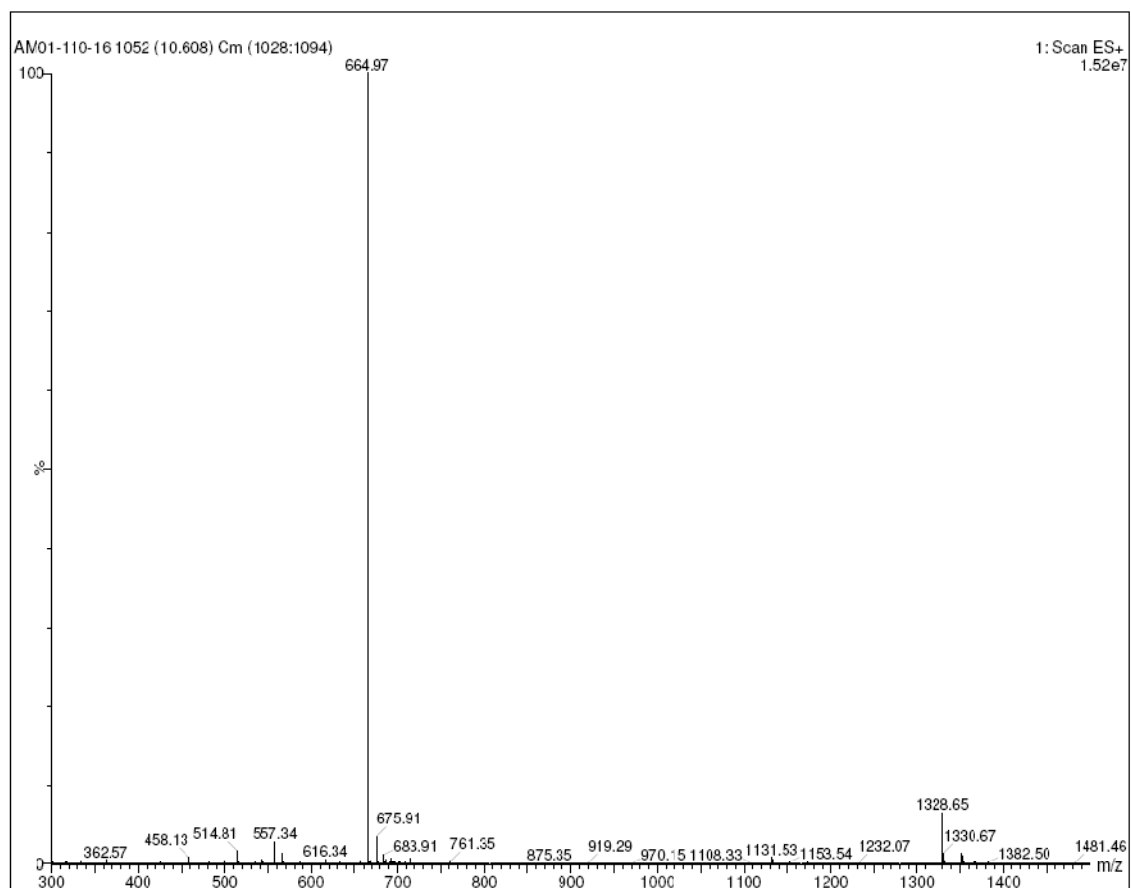
Area Percent Report

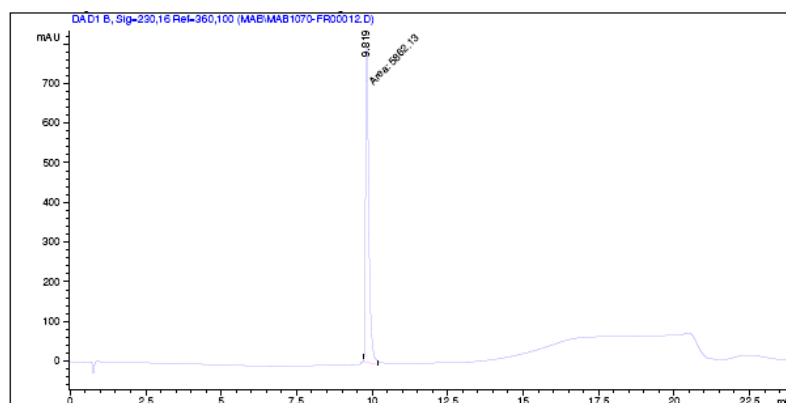
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	10.009	MM	0.1346	5337.64844	661.15326	100.0000

Totals : 5337.64844 661.15326



Ac-R-L-S-H-K-G-P-Nle-Aib-2Nal

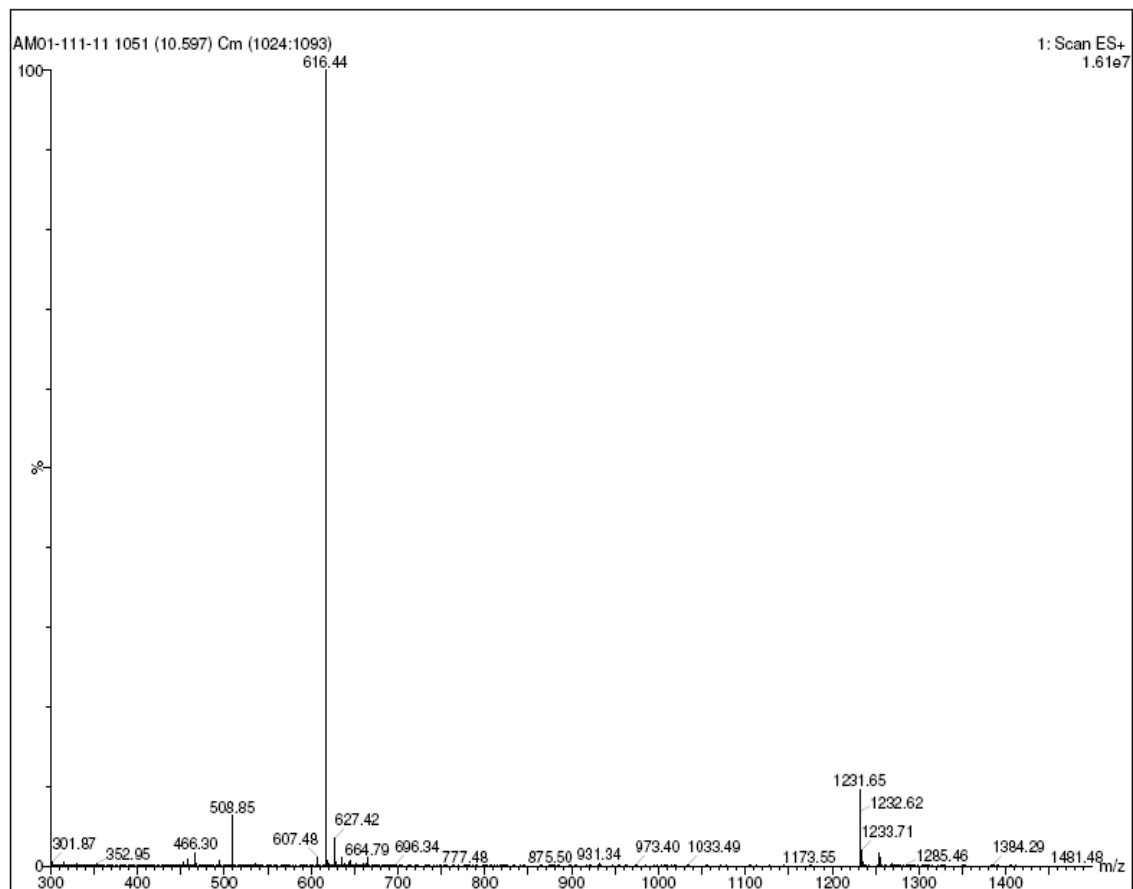
=====
Area Percent Report
=====

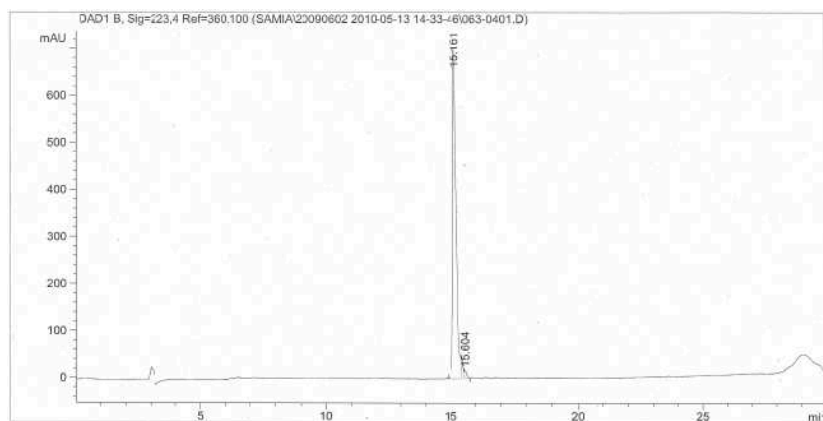
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.819	NM	0.1228	5862.13477	795.50696	100.0000

Totals : 5862.13477 795.50696



<Glu-R-P-R-L-(PEG)₄-P-Nle-P-F

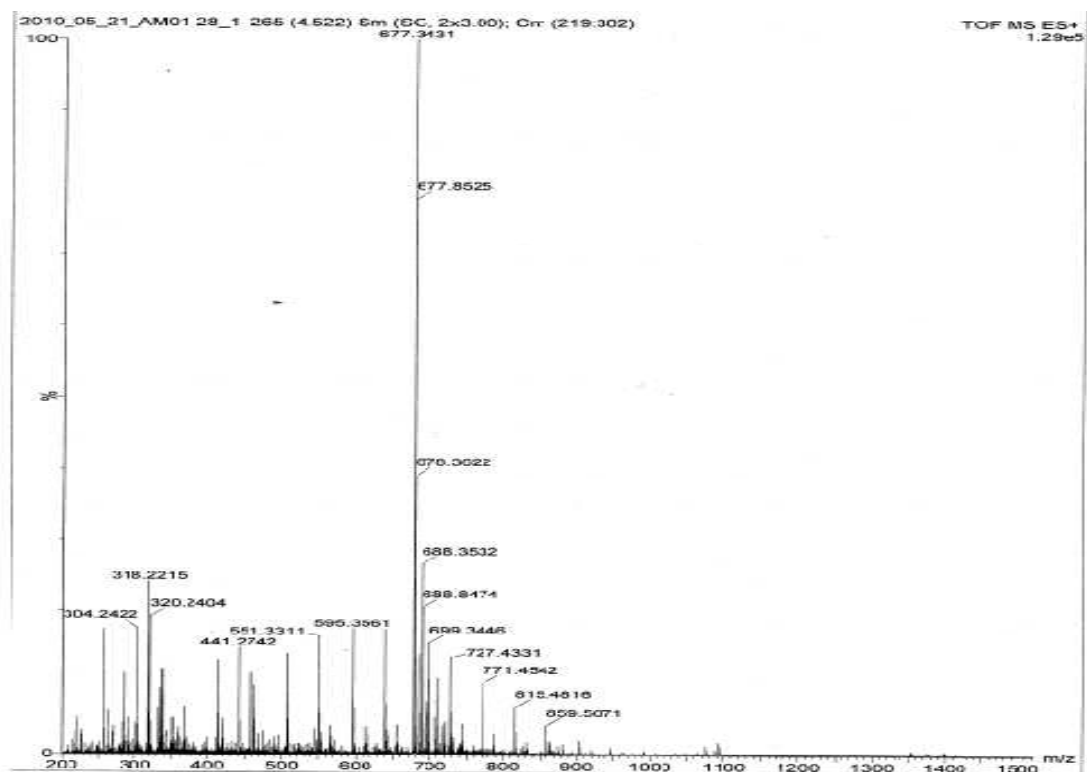
=====
Area Percent Report
=====

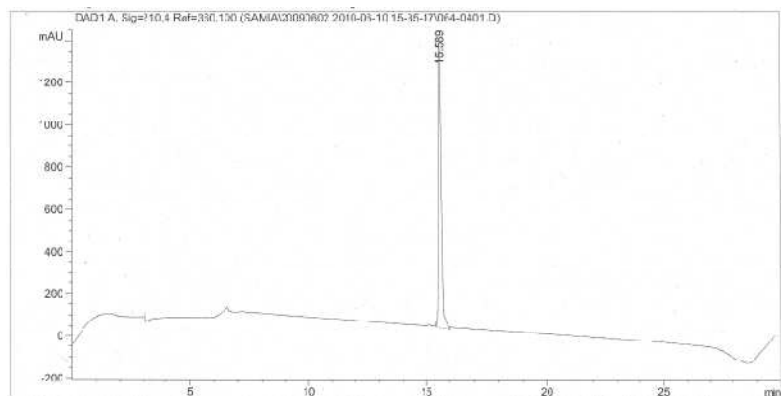
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 B, Sig=223,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	15.161	VV	0.1470	6667.59863	701.09827	98.1683
2	15.604	VV	0.1006	124.40965	17.57039	1.8317

Totals : 6792.00828 718.66866



<Glu-R-P-R-L-(PEG)₆-P-F

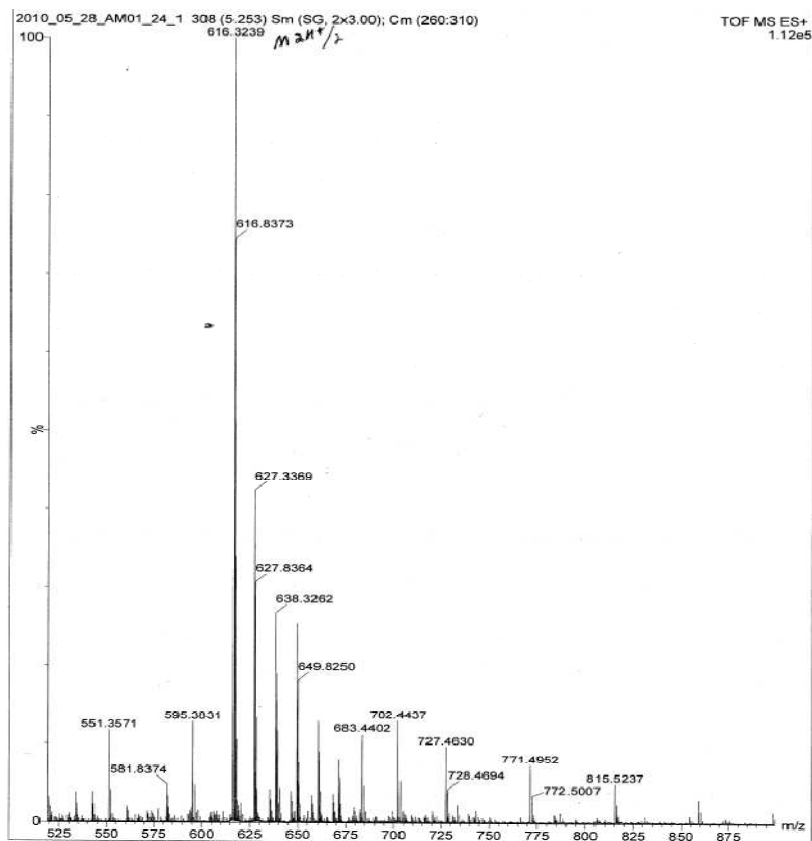
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

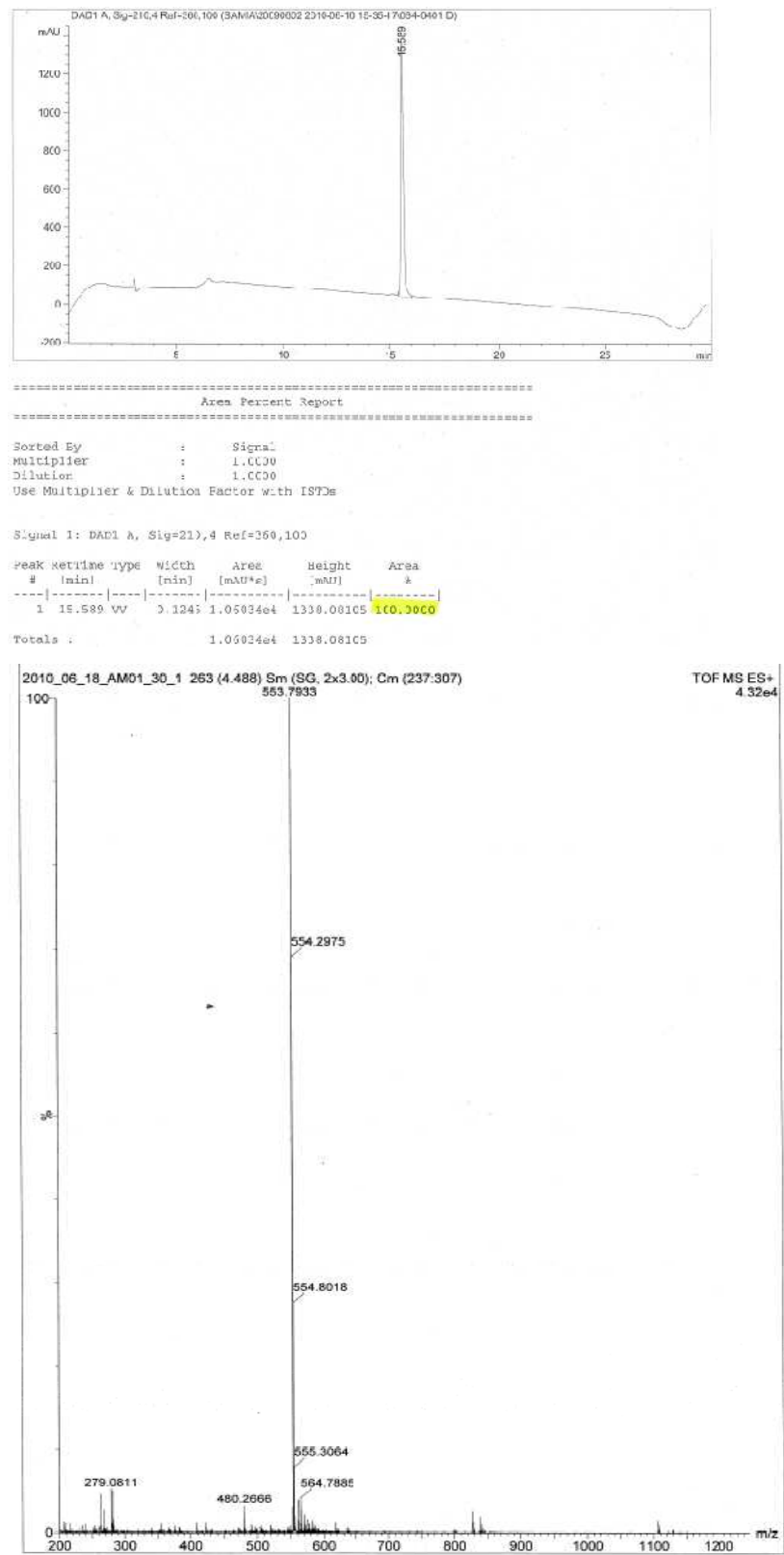
Signal 1: DAD: A, Sig=210,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nAU*s]	Height [nAU]	Area %
1	15.589	VV	0.1245	1.06034e4	1338.08105	100.0000

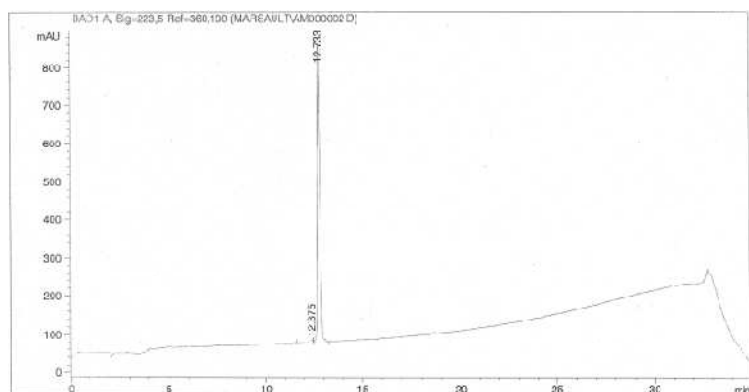
Totals : 1.06034e4 1338.08105



<Glu-R-P-R-L-P-Nle-P-F



<Glu-R-P-R-L-A-A-A-A-P-Nle-P-F



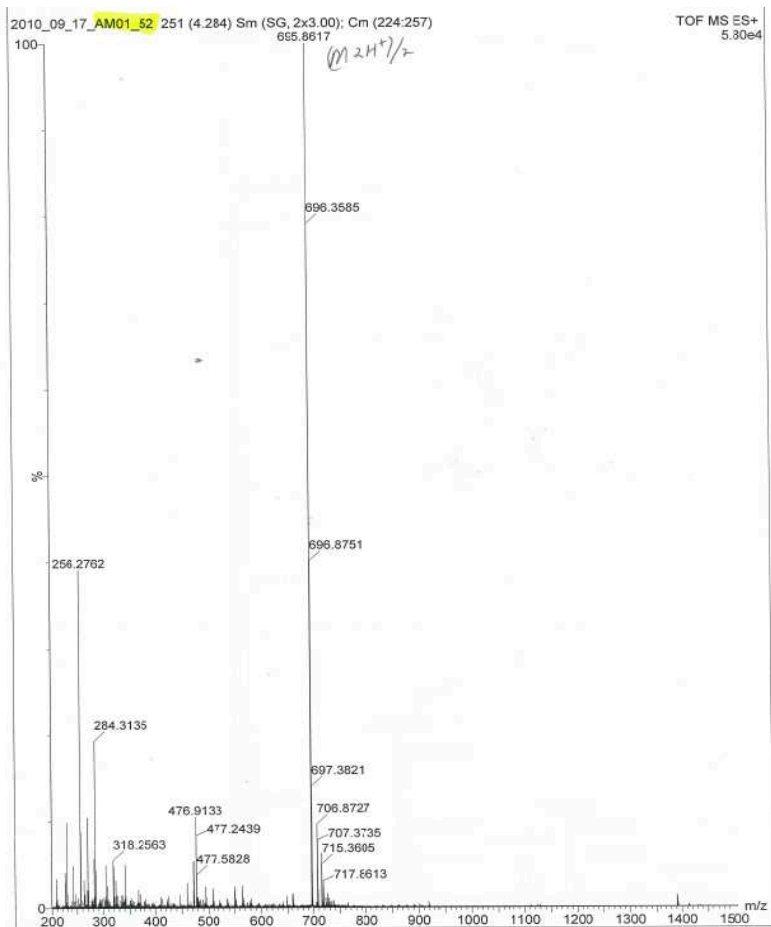
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

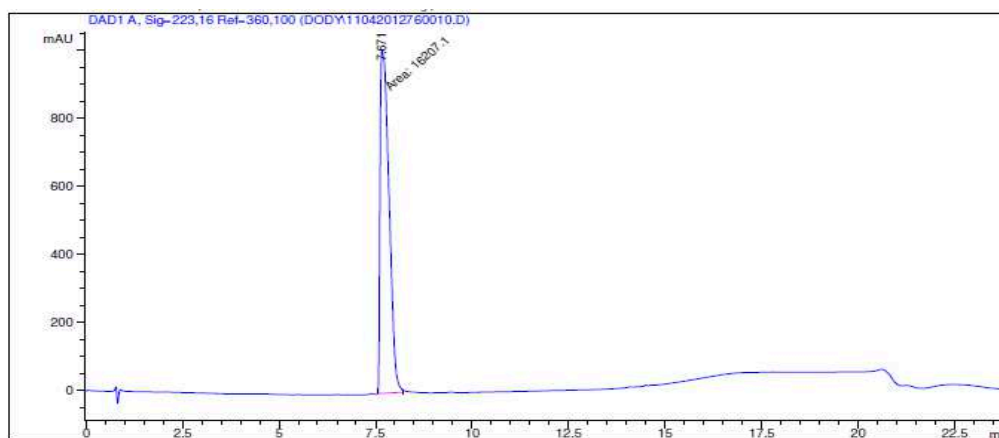
Signal 1: DAD1 A, Sig-223.5 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	12.373	VV	0.1757	102.36356	7.95532	1.5173
2	12.733	VB	0.1316	6503.03904	777.67456	53.4327

Totals : 6605.22250 785.63978



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-I



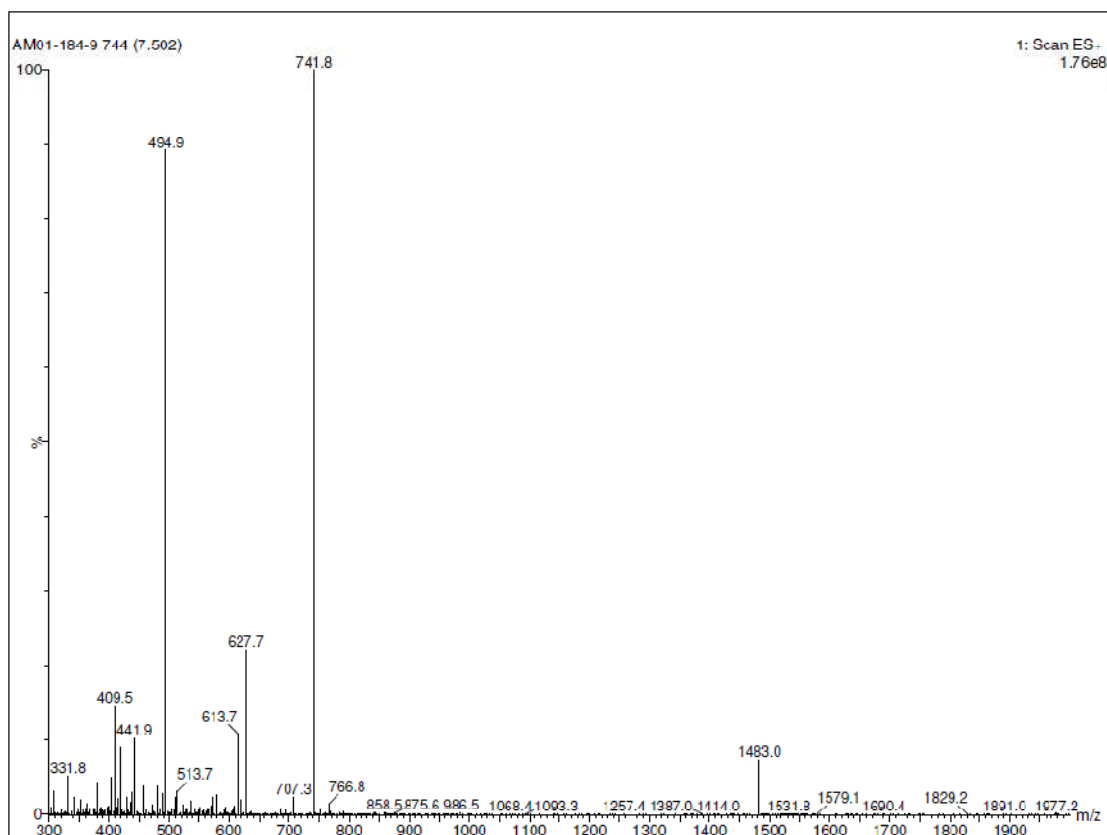
Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

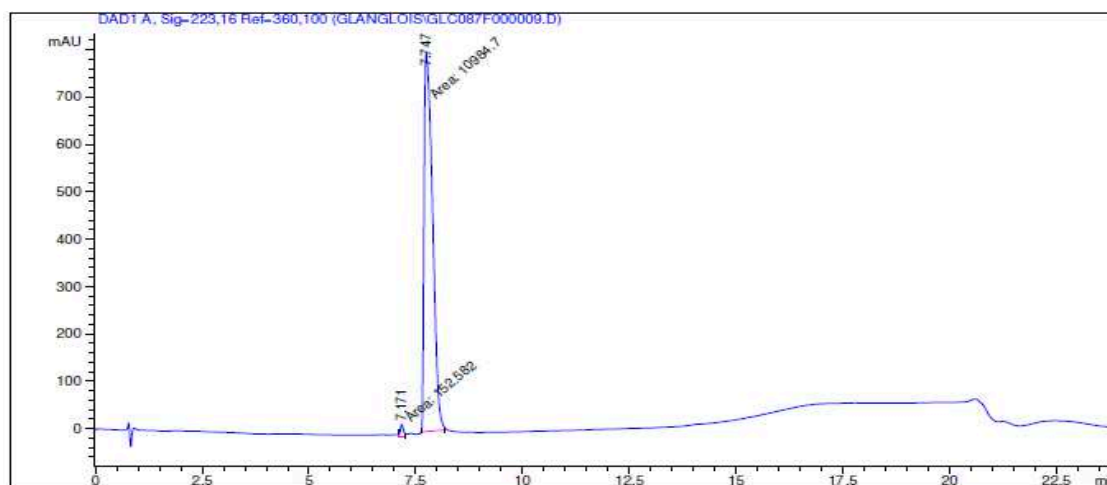
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.671	MM	0.2676	1.62071e4	1009.54517	100.0000

Totals : 1.62071e4 1009.54517



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-L



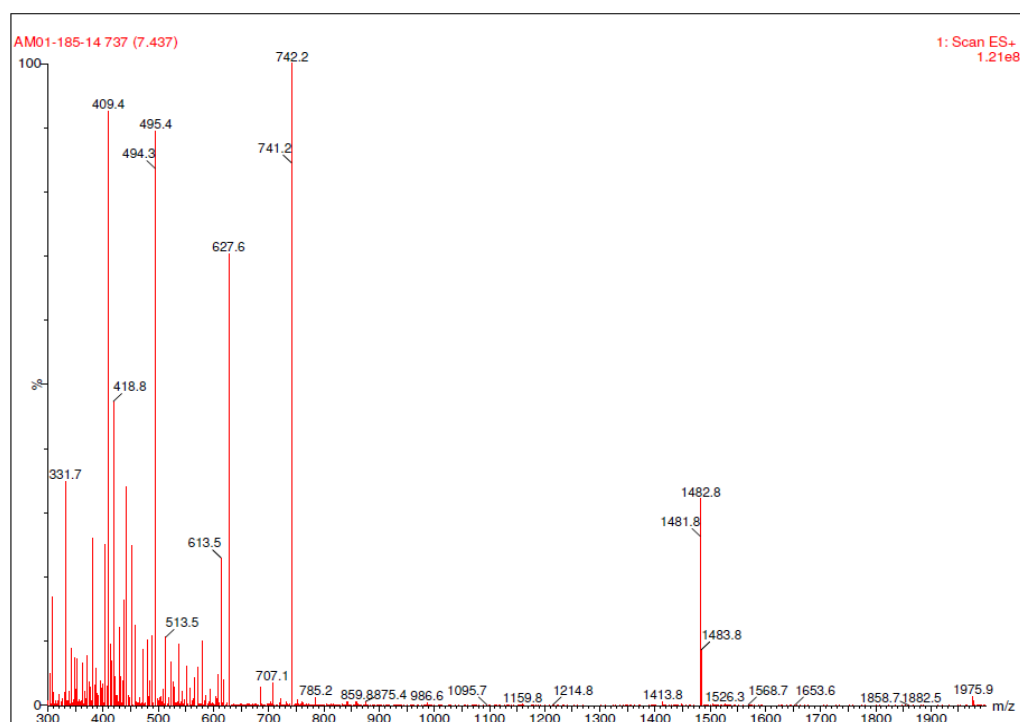
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

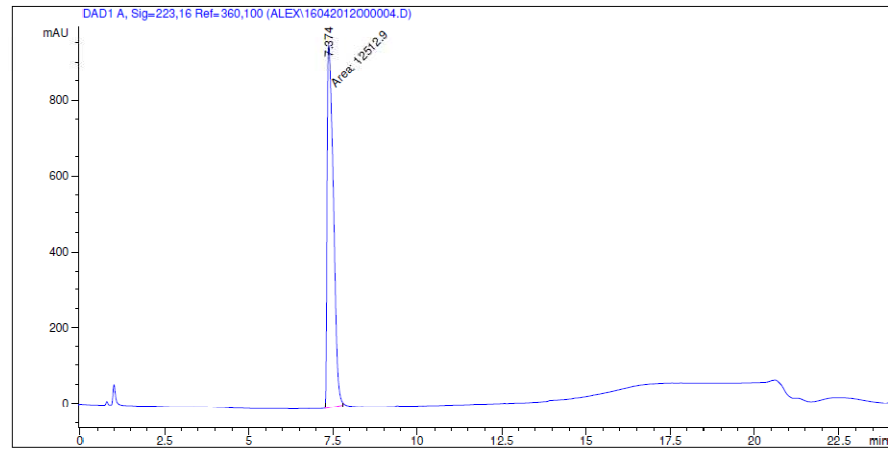
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.171	MM	0.0944	152.58171	26.93316	1.3700
2	7.747	MM	0.2294	1.09847e4	798.23657	98.6300

Totals : 1.11373e4 825.16973



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-V



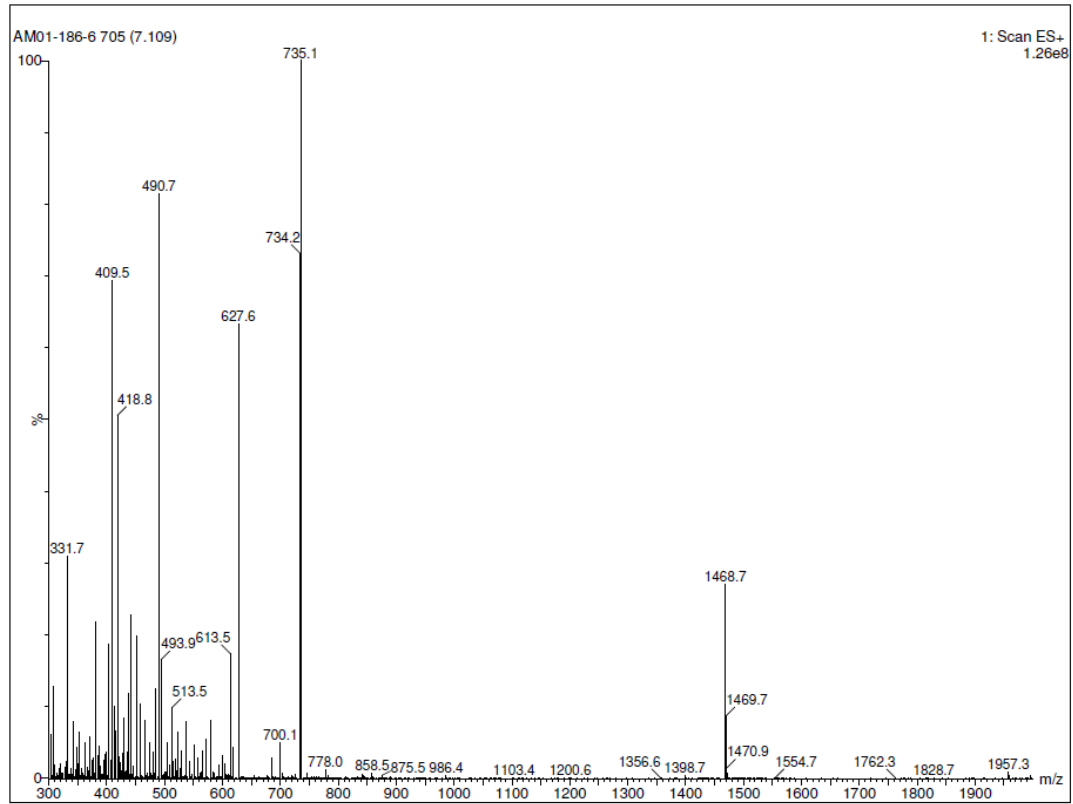
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

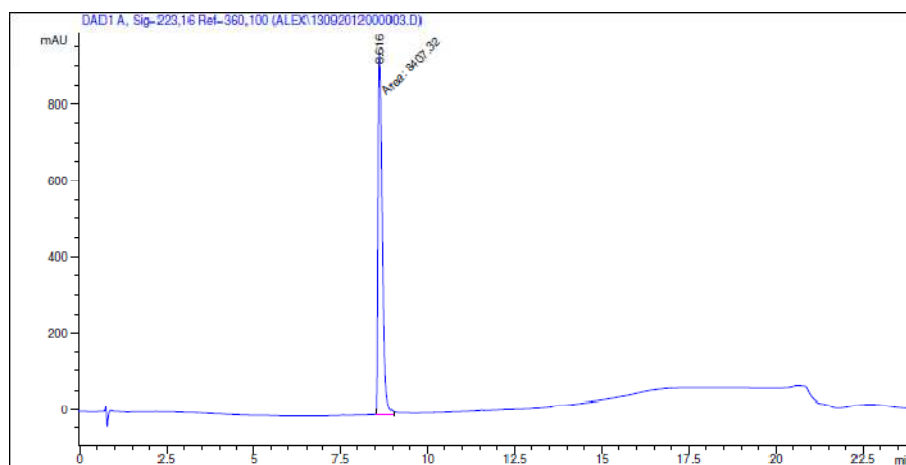
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.374	MM	0.2179	1.25129e4	957.02643	100.0000

Totals : 1.25129e4 957.02643



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OMe)



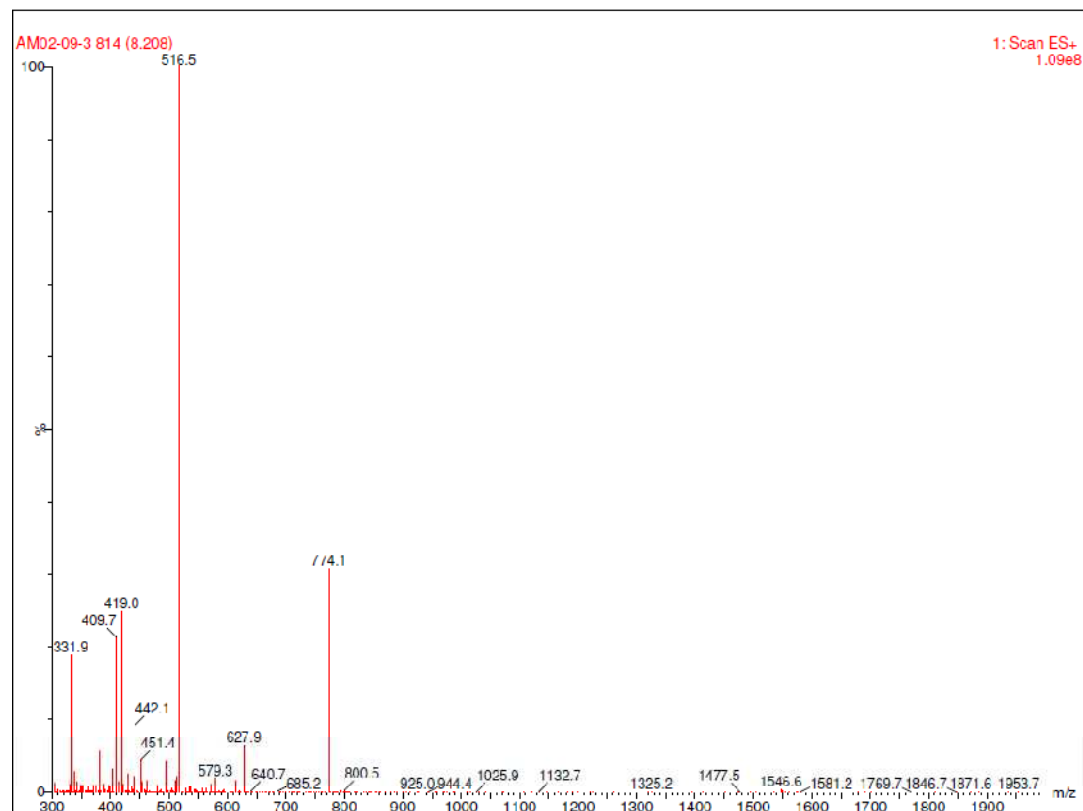
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

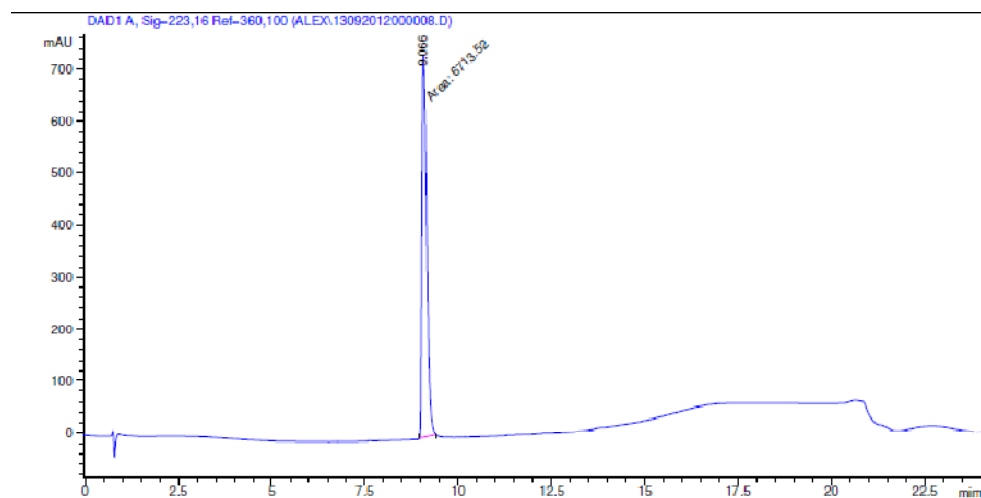
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.616	MM	0.1474	8407.31836	950.51660	100.0000

Totals : 8407.31836 950.51660



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Phe(4-Me)



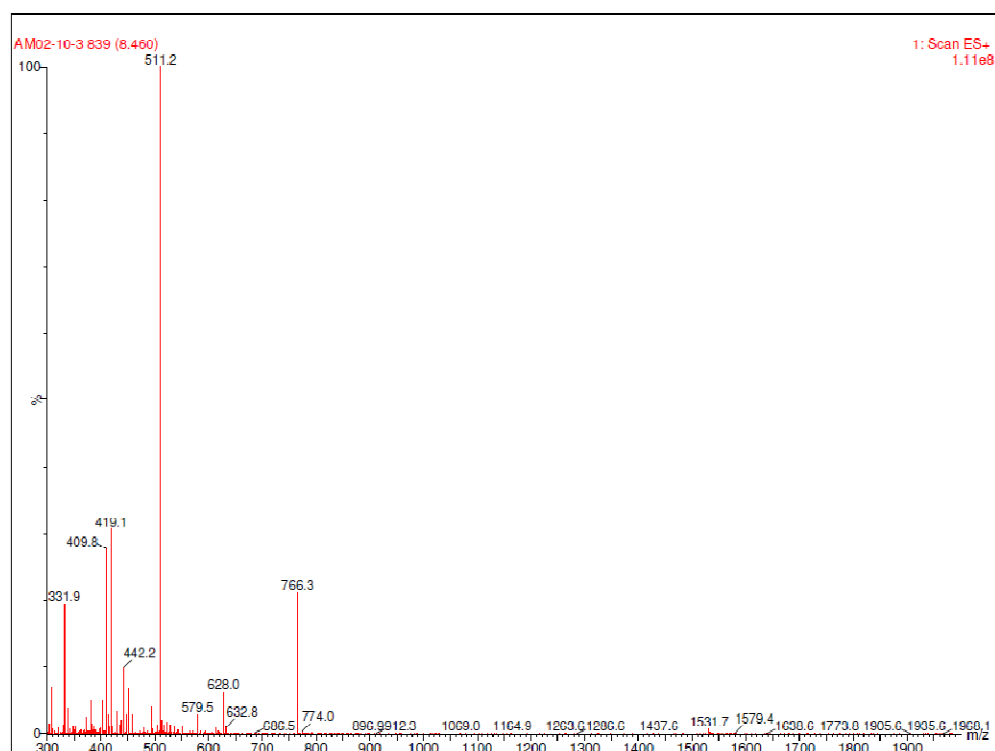
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

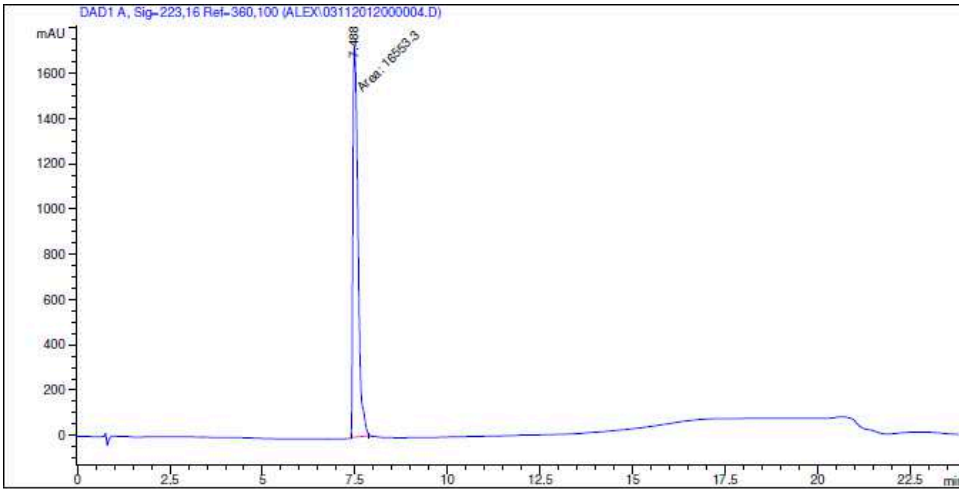
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.066	MM	0.1519	6713.51904	736.66827	100.0000

Totals : 6713.51904 736.66827



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(4-pyridyl)Ala



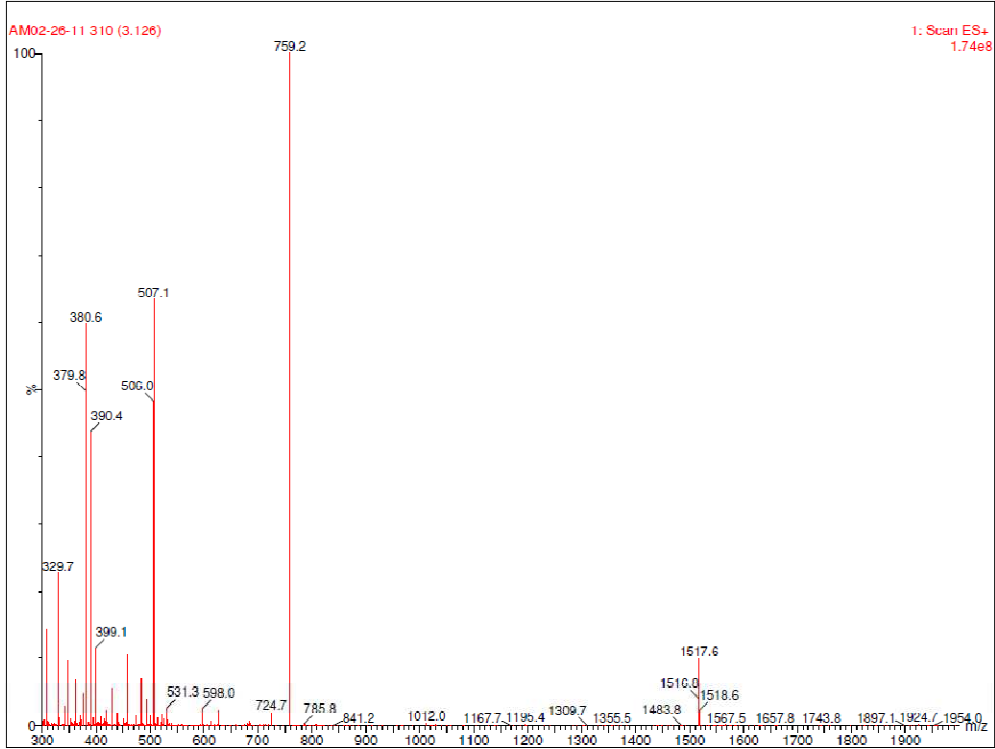
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

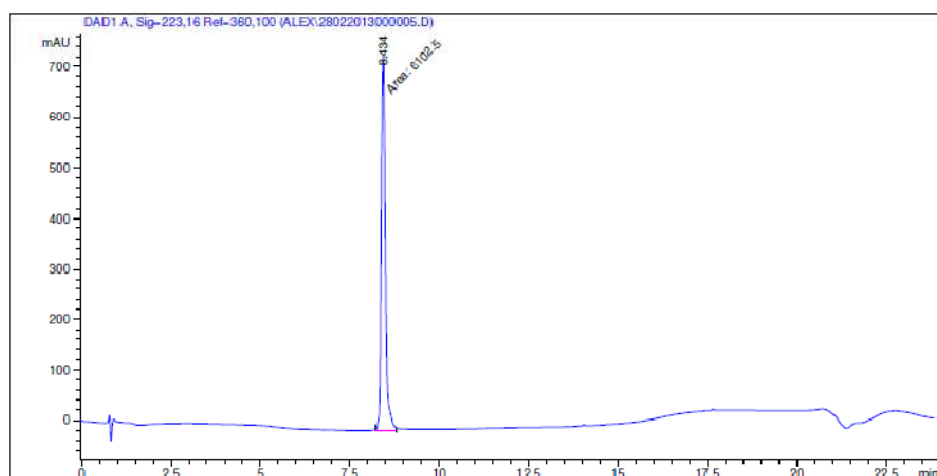
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.488	MM	0.1595	1.65533e4	1729.92737	100.0000

Totals : 1.65533e4 1729.92737



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-pyridyl)Ala



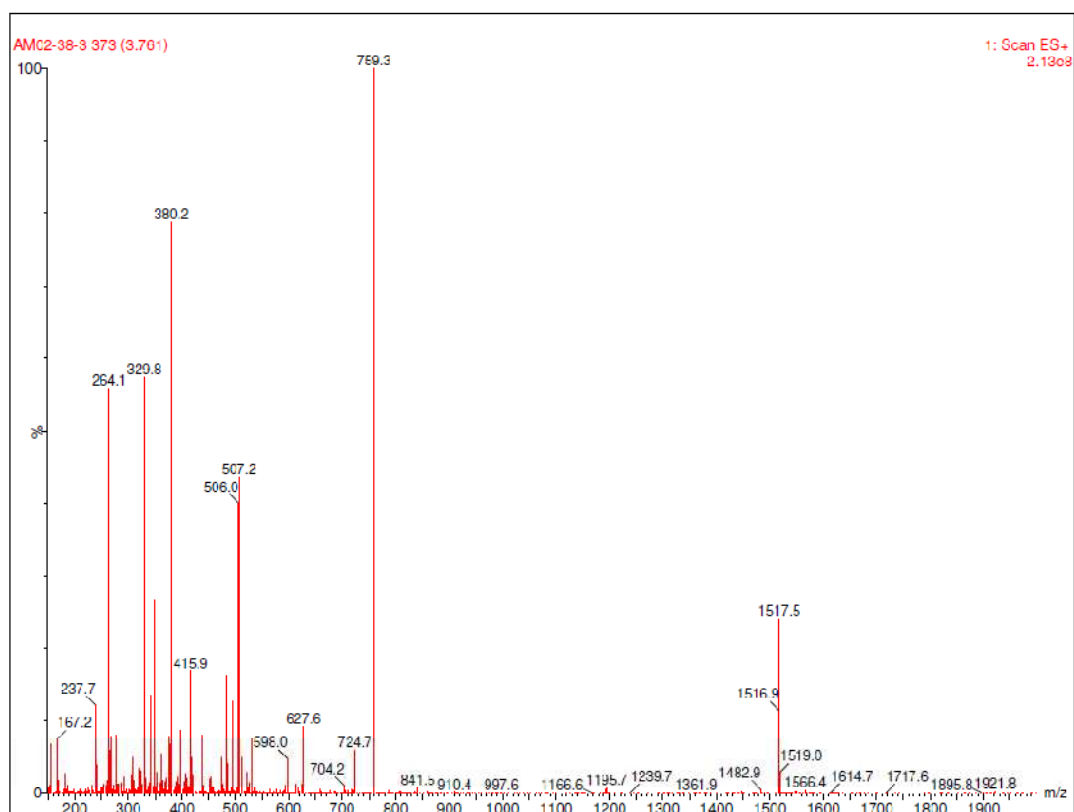
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

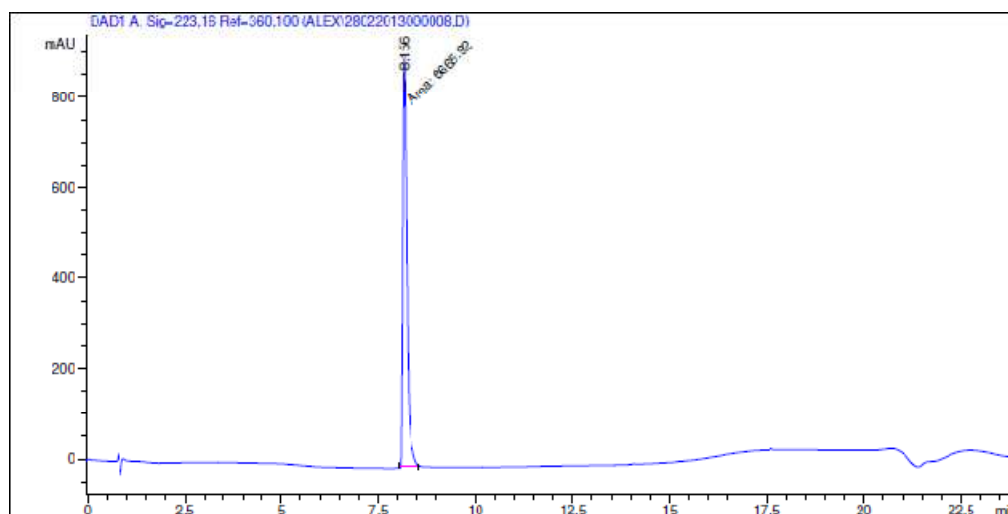
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.434	MM	0.1364	6102.50391	745.59265	100.0000

Totals : 6102.50391 745.59265



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(2-pyridyl)Ala



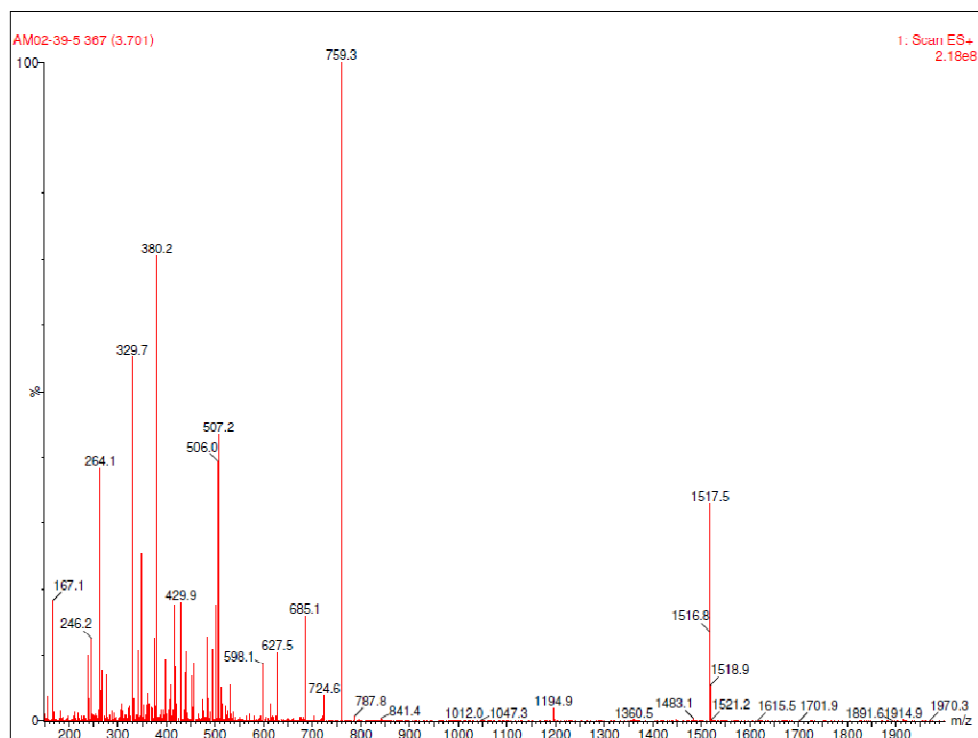
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

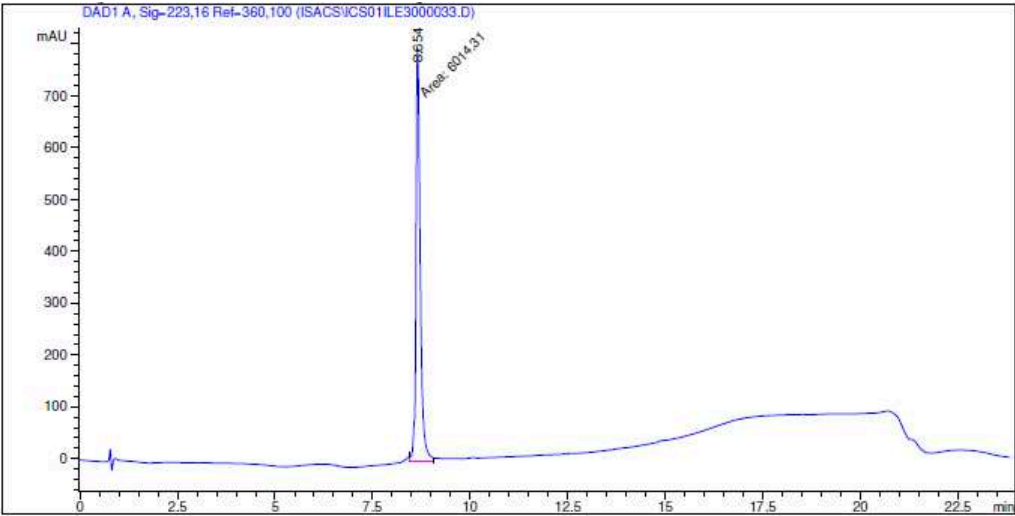
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.156	MM	0.1225	6665.91846	906.76752	100.0030

Totals : 6665.91846 906.76752



10 : <Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-PheGly



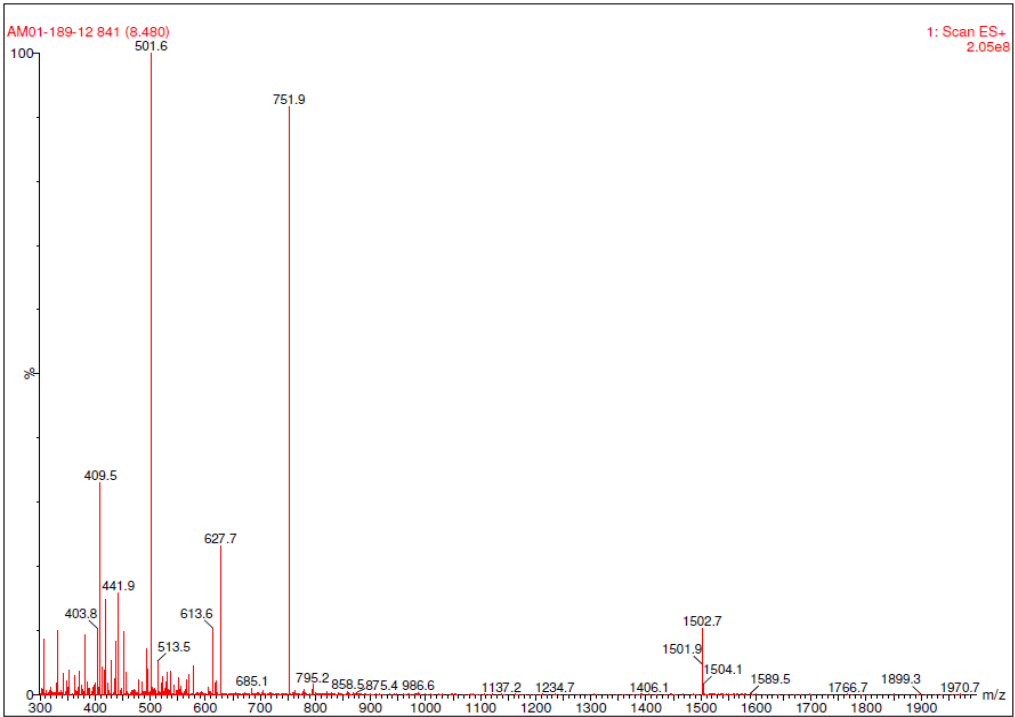
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

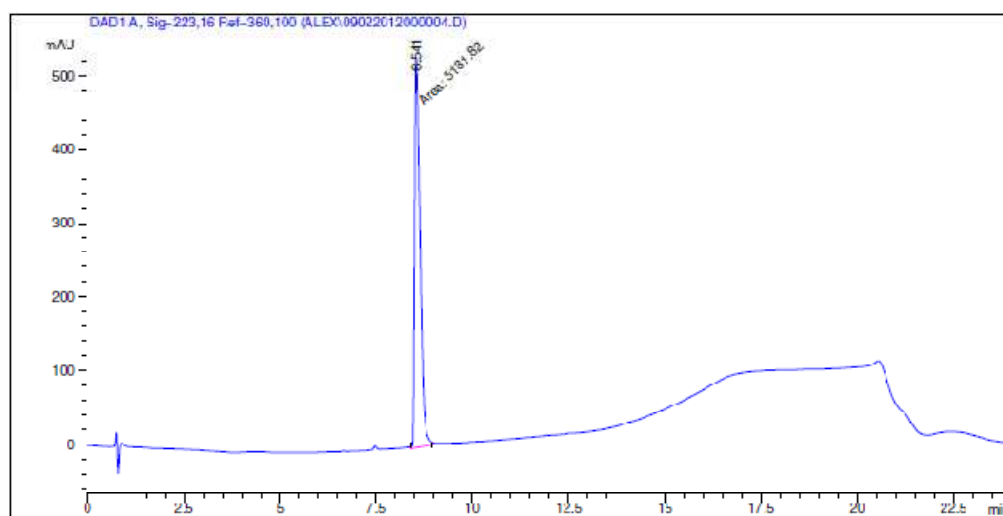
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.654	MM	0.1259	6014.31494	795.99689	100.0000

Totals : 6014.31494 795.99689



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-HoPhe



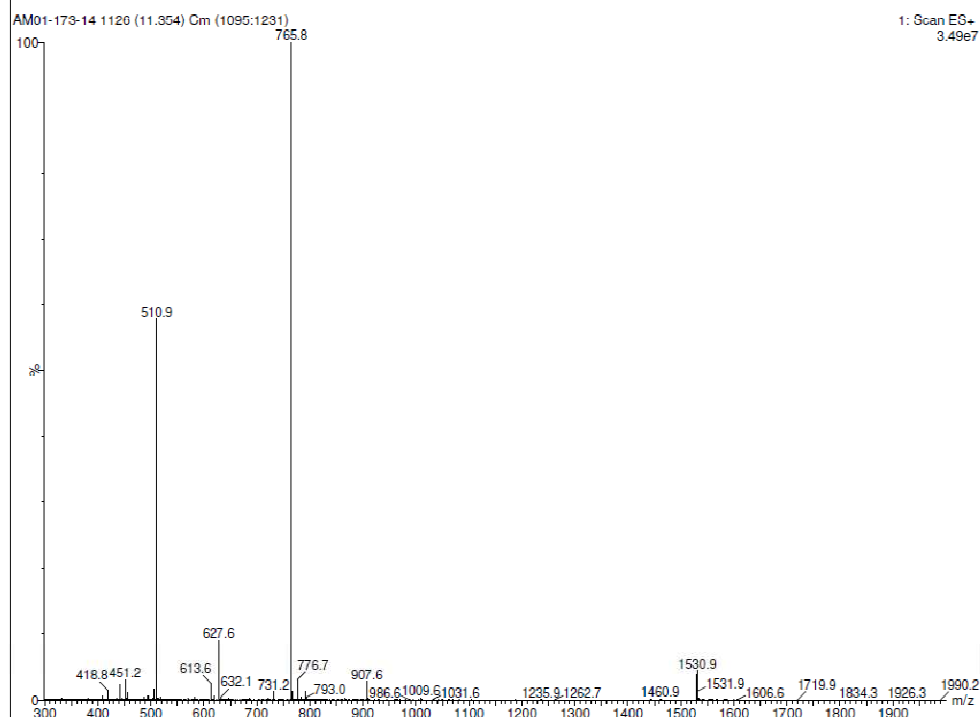
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier * Dilution Factor with ISTDs

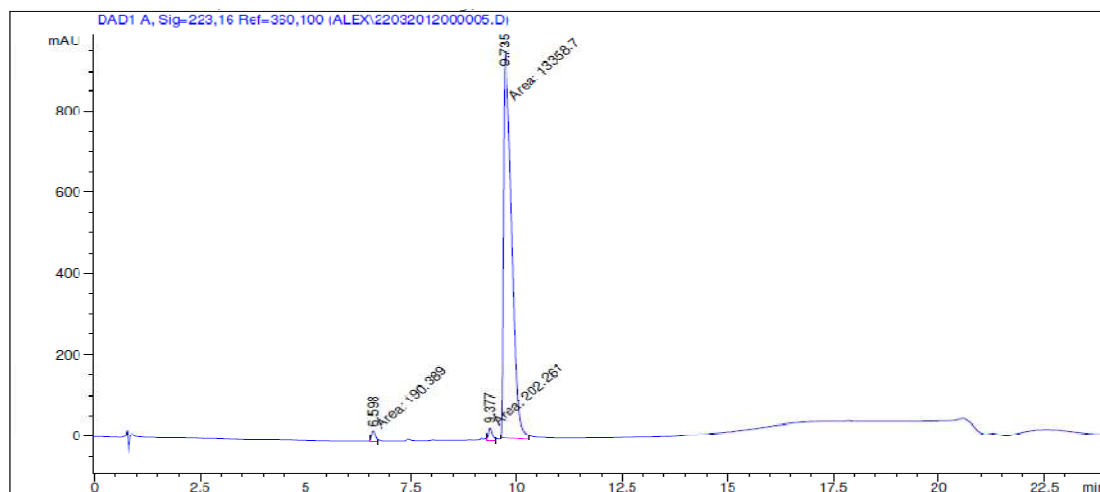
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.541	PM	0.1634	5181.81592	528.66577	100.0000

Totals : 5181.81592 528.66577



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)



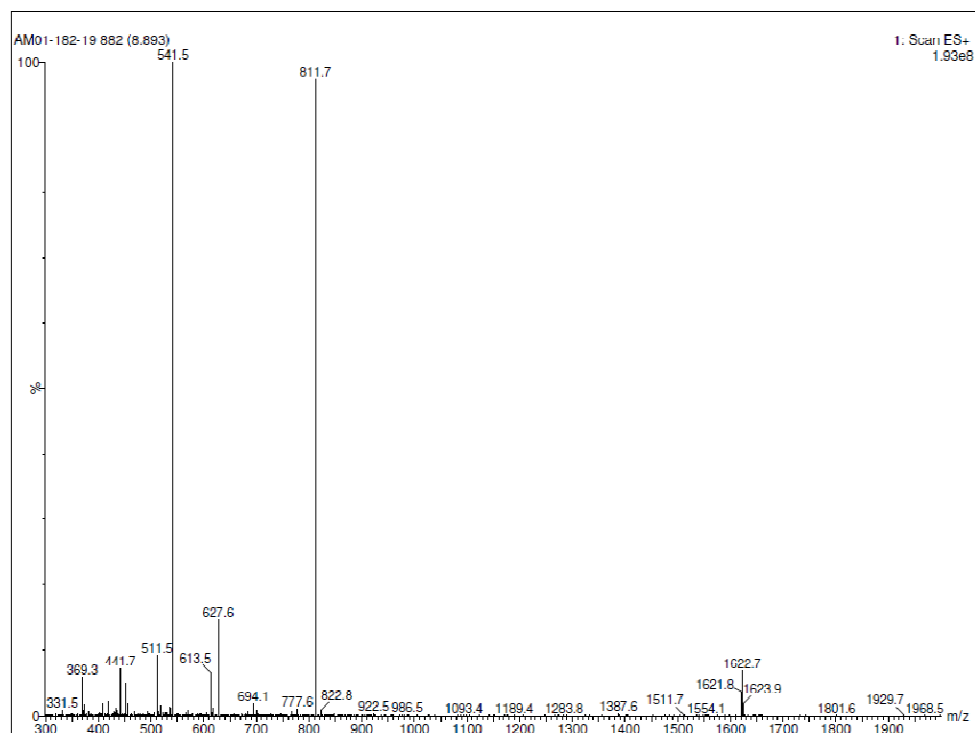
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

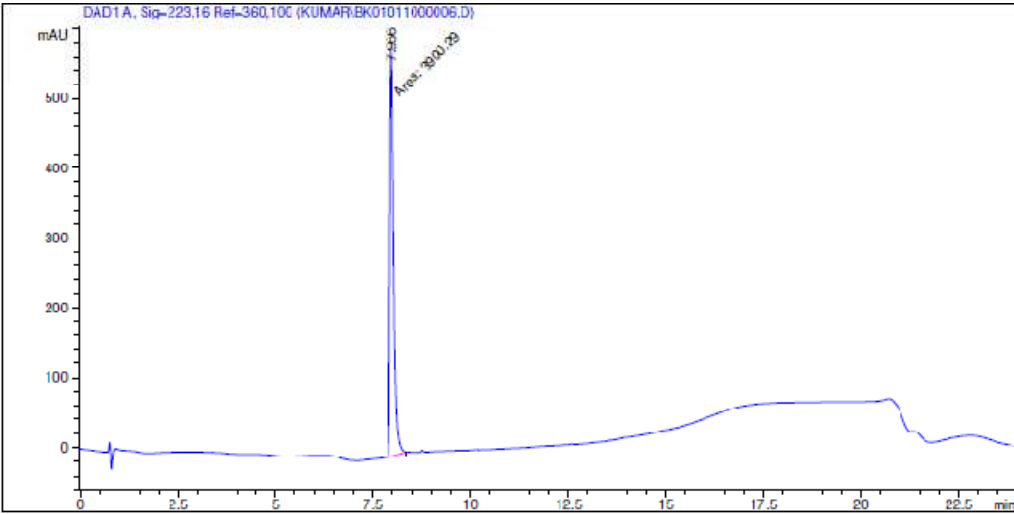
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.598	MM	0.1064	190.38918	29.81042	1.3845
2	9.377	MM	0.1011	202.26079	33.34491	1.4708
3	9.735	MM	0.2345	1.33587e4	949.50470	97.1446

Totals : 1.37513e4 1012.66003



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Bpa



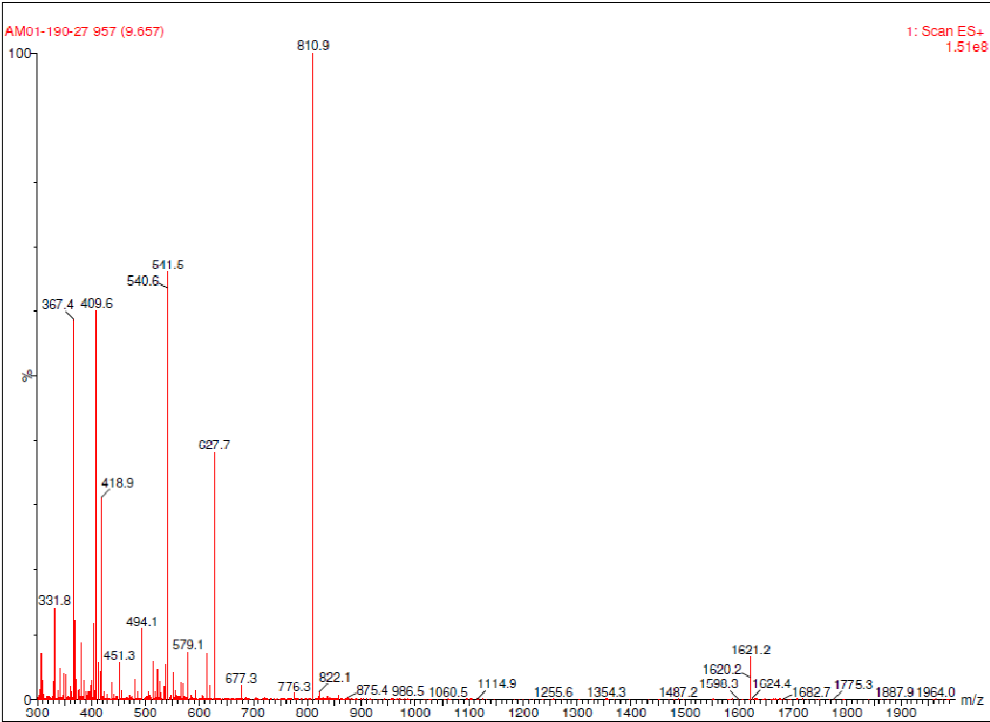
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

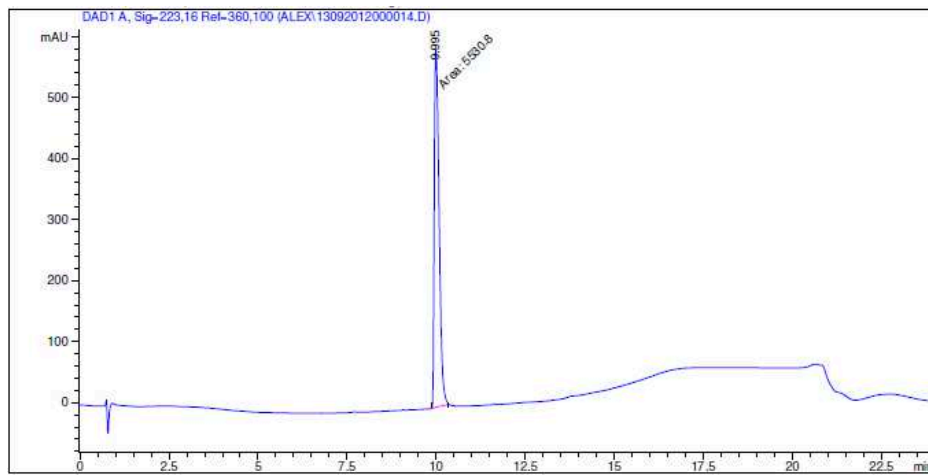
Signal 1: DAD1 A, Sig=223.16 Ref=360.100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.966	NM	0.1110	3900.29150	585.76300	100.0000

Totals : 3900.29150 585.76300



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-StyrylAla



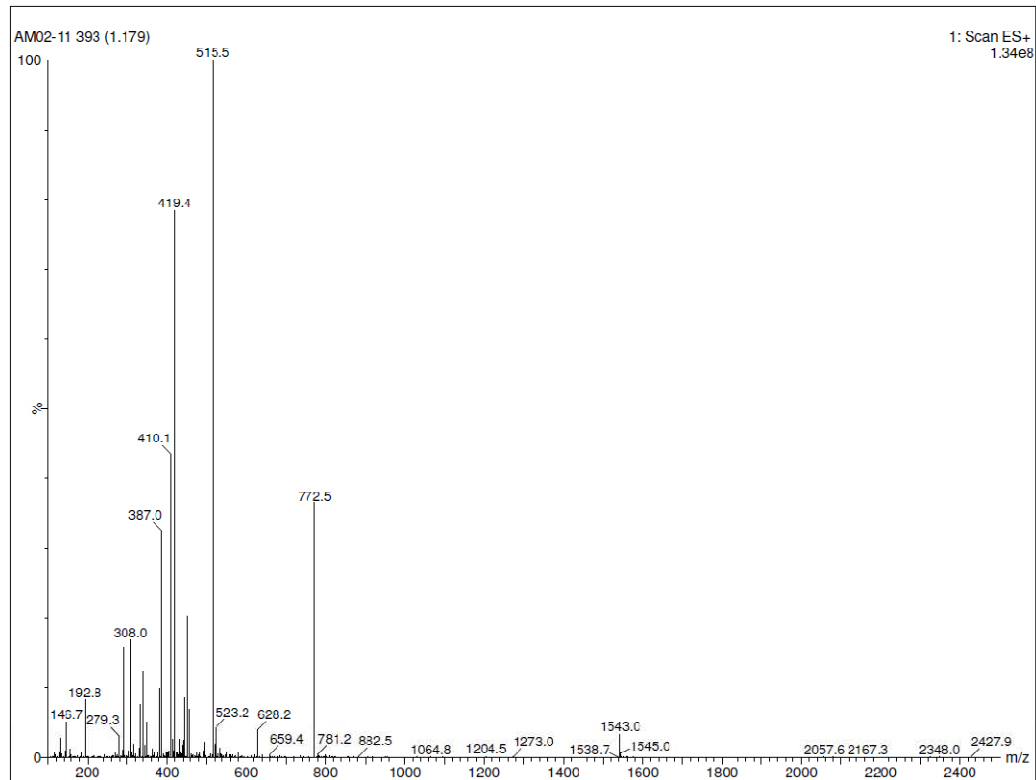
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

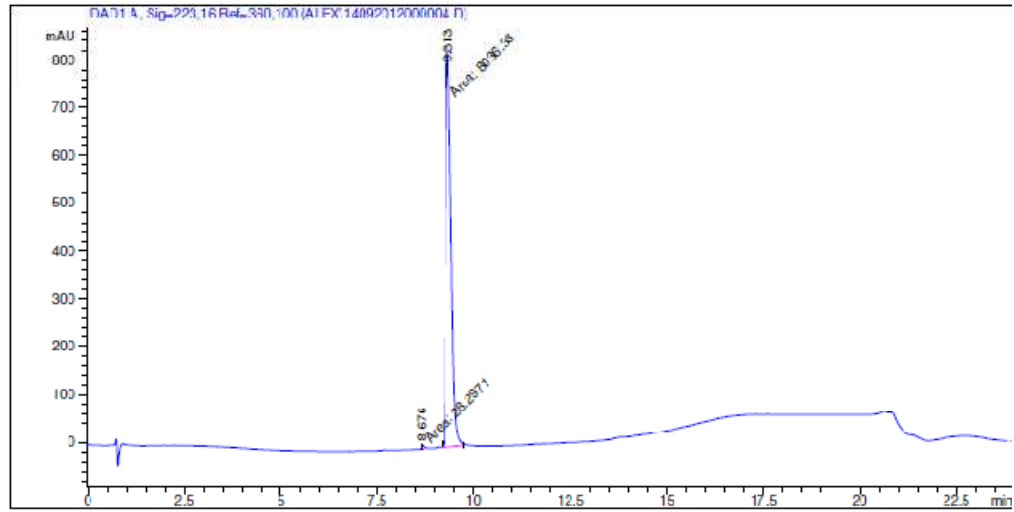
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.995	MM	0.1570	5530.80029	586.97113	100.0000

Totals : 5530.80029 586.97113



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-dihydroAnthranylAla



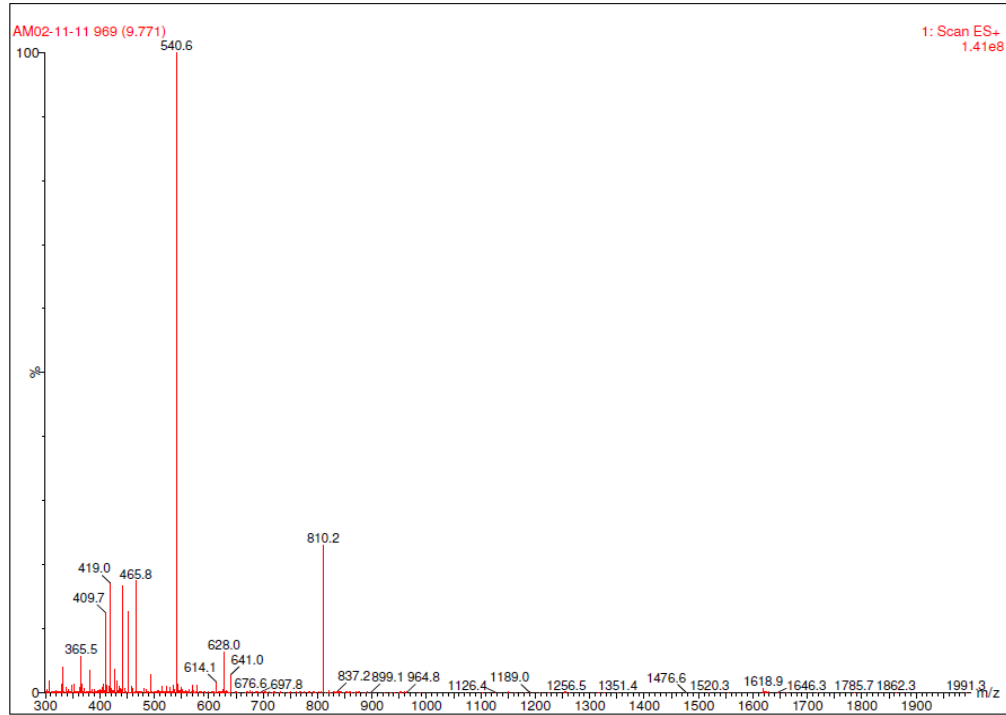
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

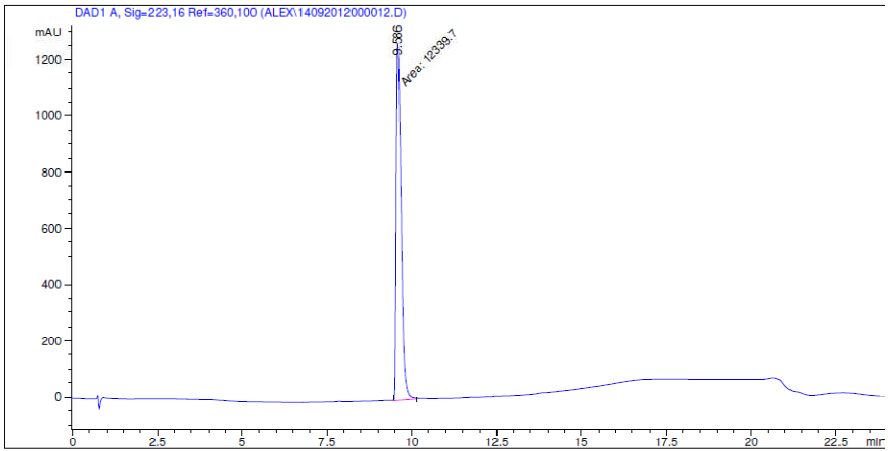
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=350,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.476	MM	0.0610	29.29797	7.73772	0.3509
2	9.313	MM	0.1612	8036.32910	831.02582	99.6491

Totals : 8054.62617 838.76354



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(3-benzothienyl)Ala



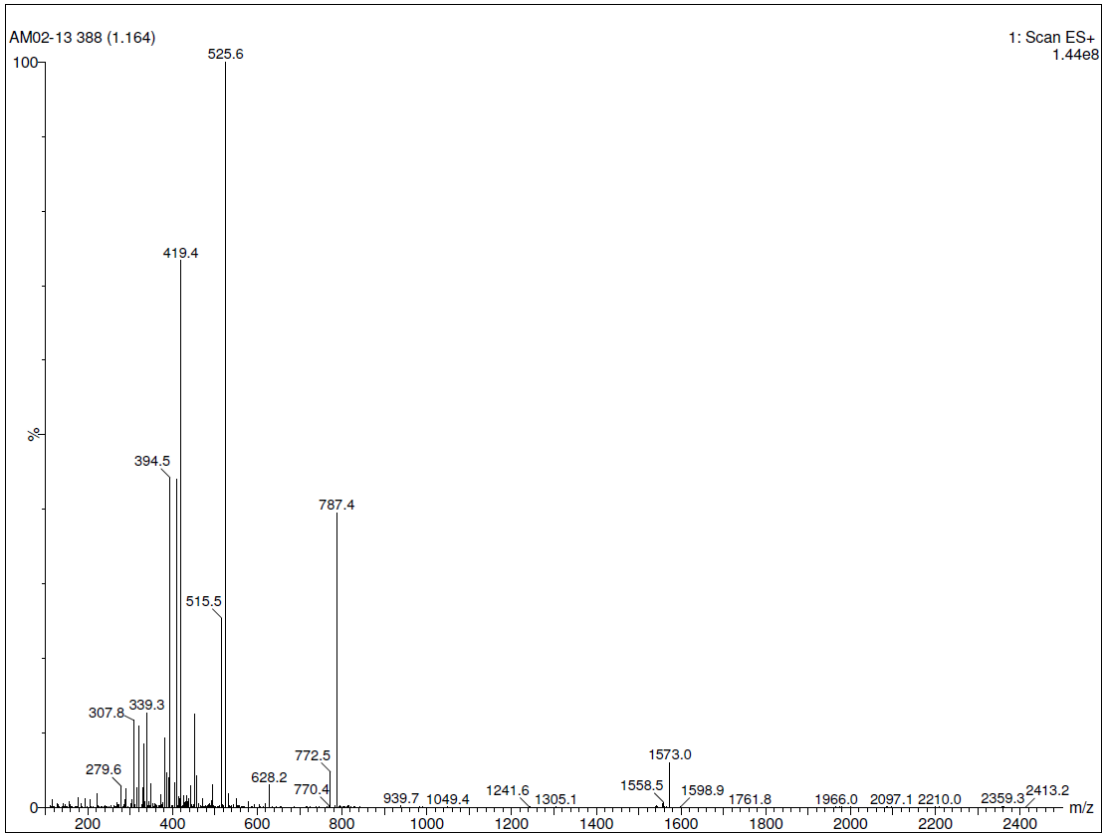
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

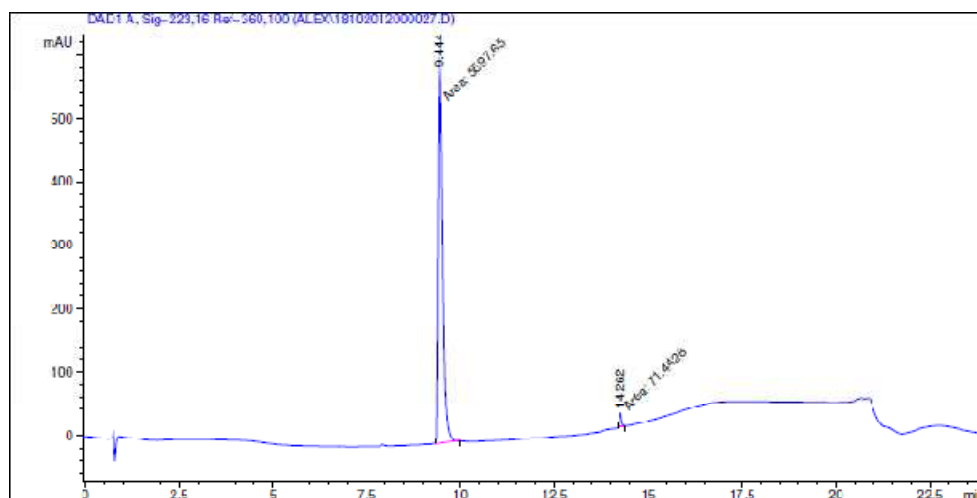
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.586	MM	0.1624	1.23397e4	1266.43567	100.0000

Totals : 1.23397e4 1266.43567



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(L- α -Me)F



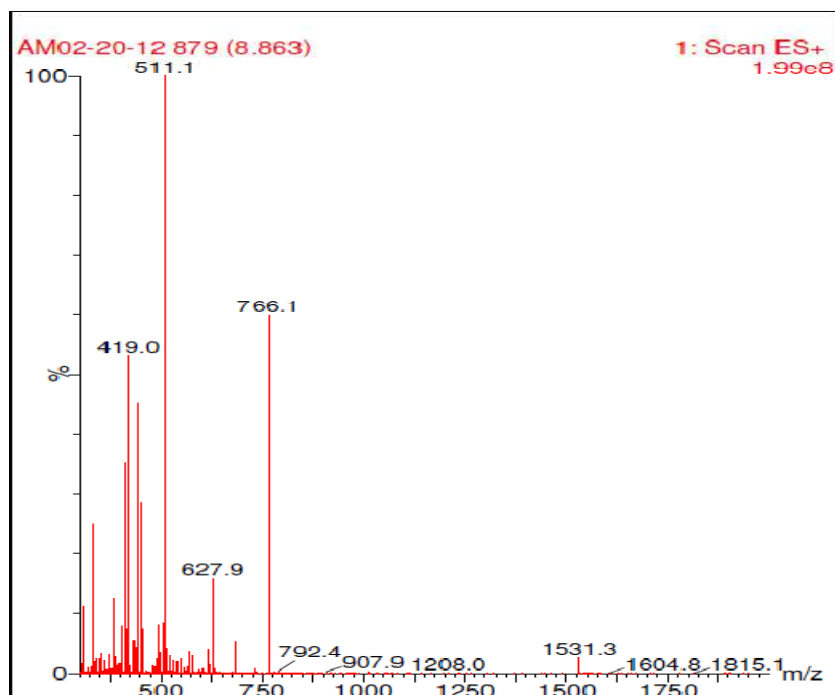
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

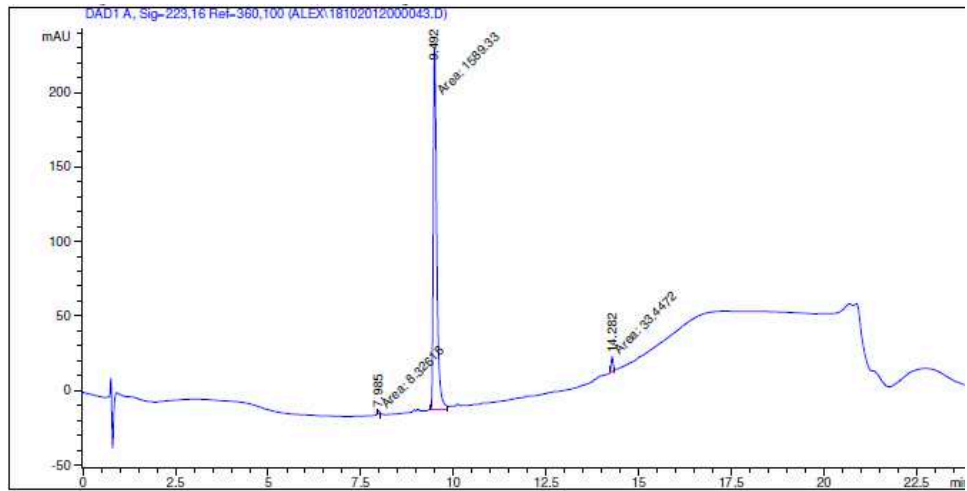
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.444	MM	0.1521	5597.54941	613.24597	96.7198
2	14.262	MM	0.0582	71.46277	20.45813	1.2602

Totals : 5669.09219 633.71407



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-(D- α -Me)F

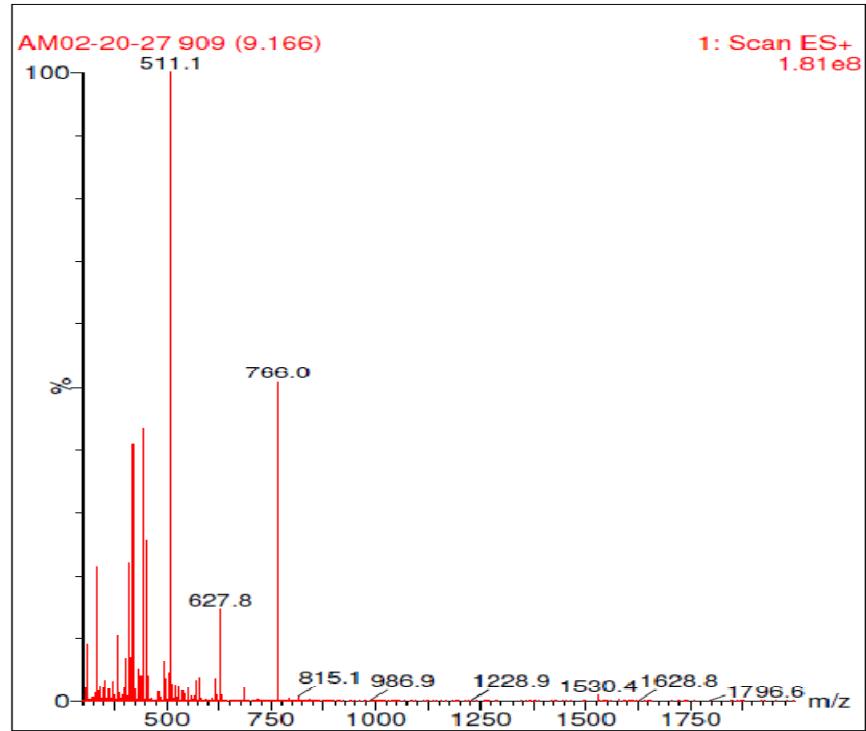


Area Percent Report

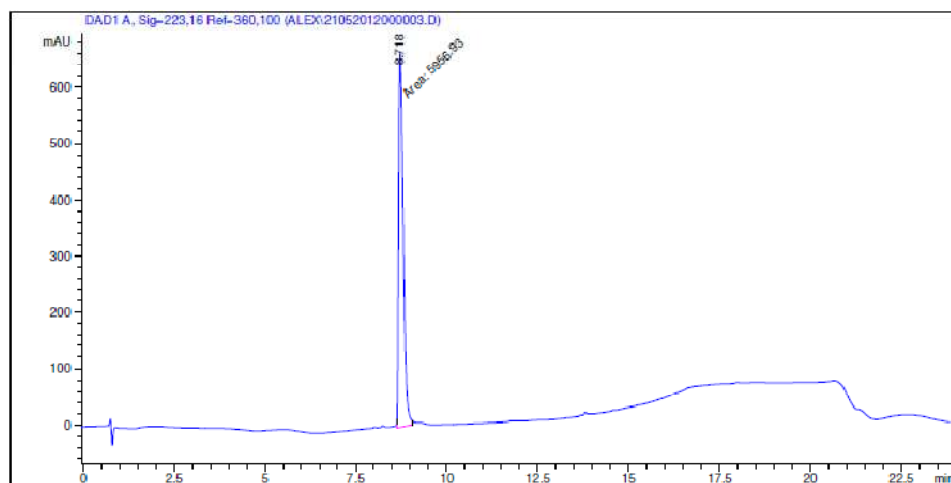
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.985	MM	0.0658	8.32618	2.10846	0.5105
2	9.492	MM	0.1094	1589.33167	242.05826	97.4390
3	14.282	MM	0.0555	33.44718	10.03586	2.0506
Totals :				1631.10503	254.20258	



<Glu-R-P-R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Aminoindane



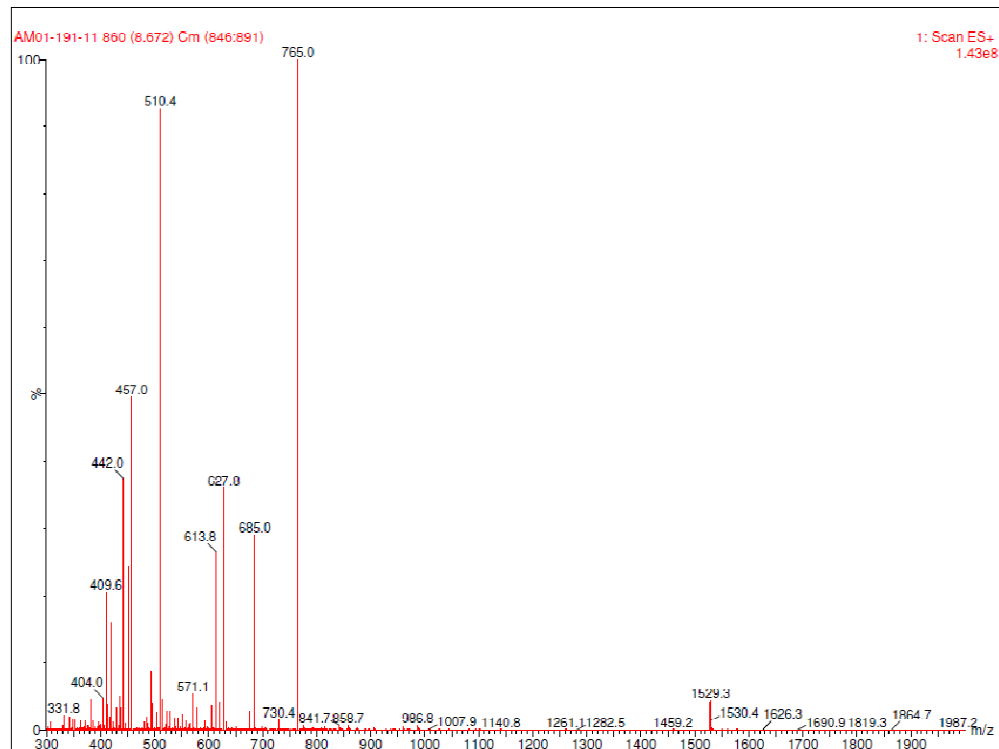
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

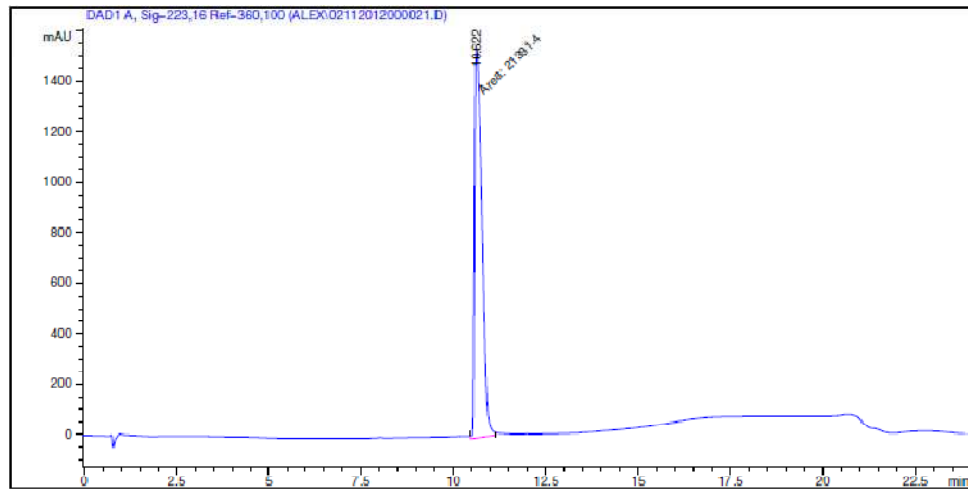
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.718	MM	0.1493	5956.93018	665.07245	100.0000

Totals : 5956.93018 665.07245



R-L-S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)



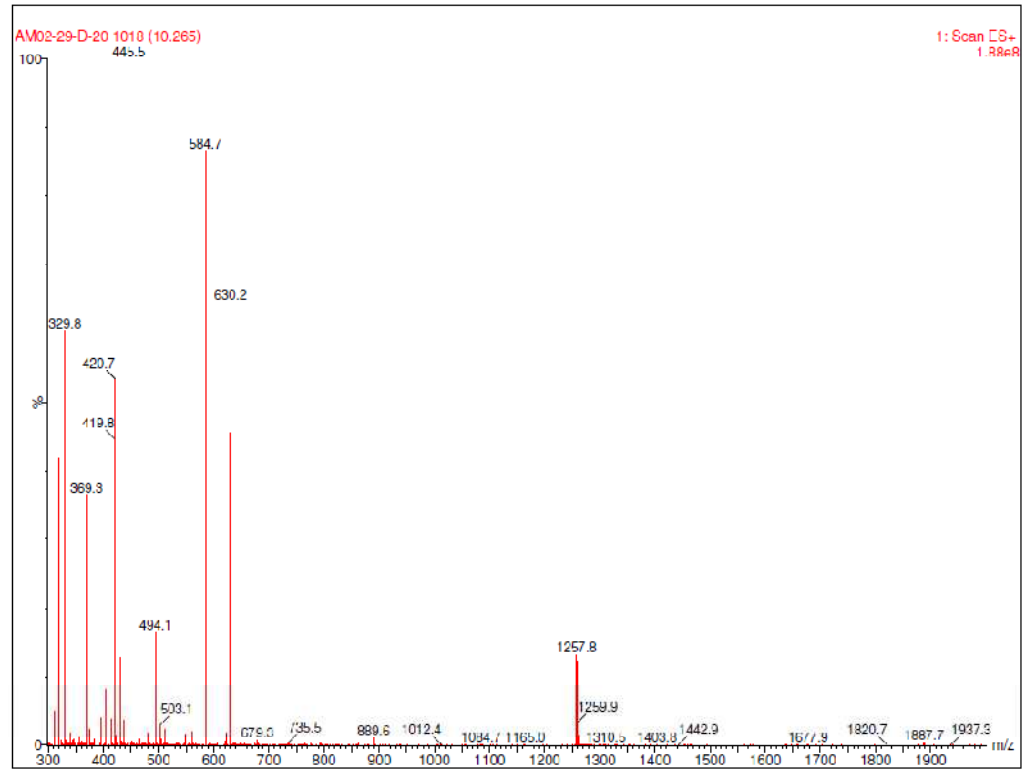
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

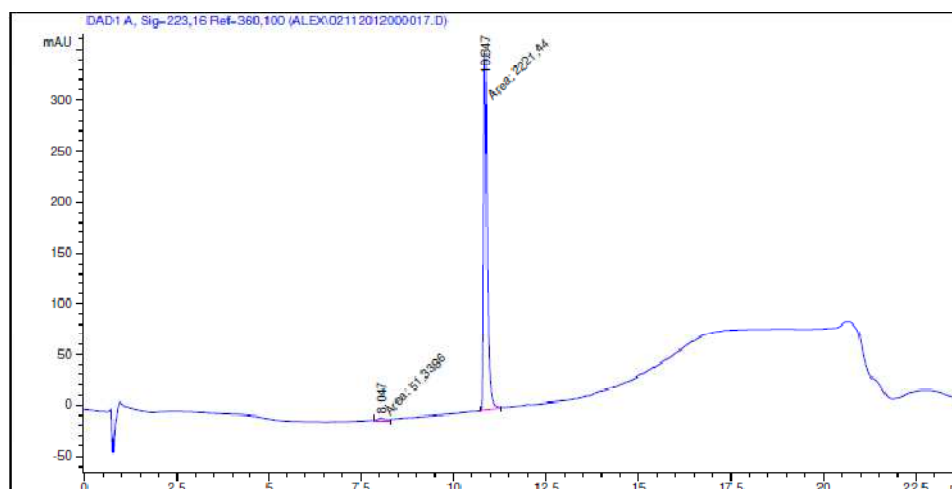
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	10.622	MM	0.2312	2.13914e4	1542.19189	100.0000

Totals : 2.13914e4 1542.19189



S-H-K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)



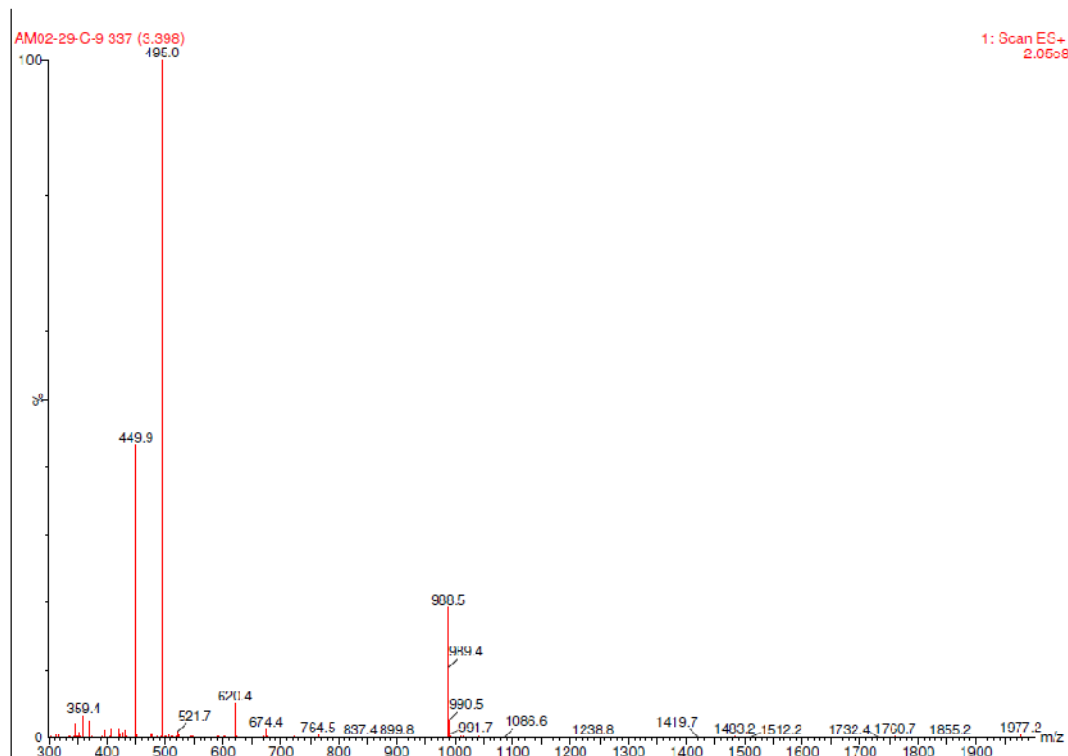
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

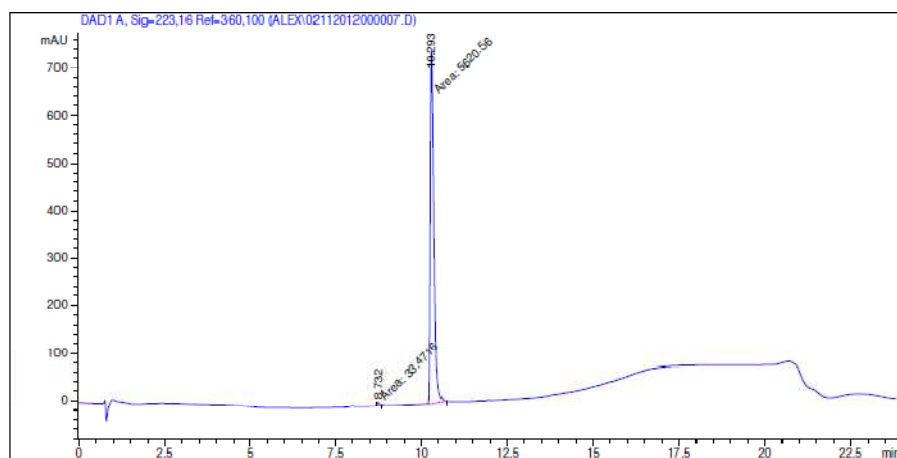
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.047	MM	0.2933	51.33865	2.91766	2.2588
2	10.847	MM	0.1056	2221.44336	350.59900	97.7412

Totals : 2272.78201 353.51666



K-G-P-Nle-P-Tyr(OBn)



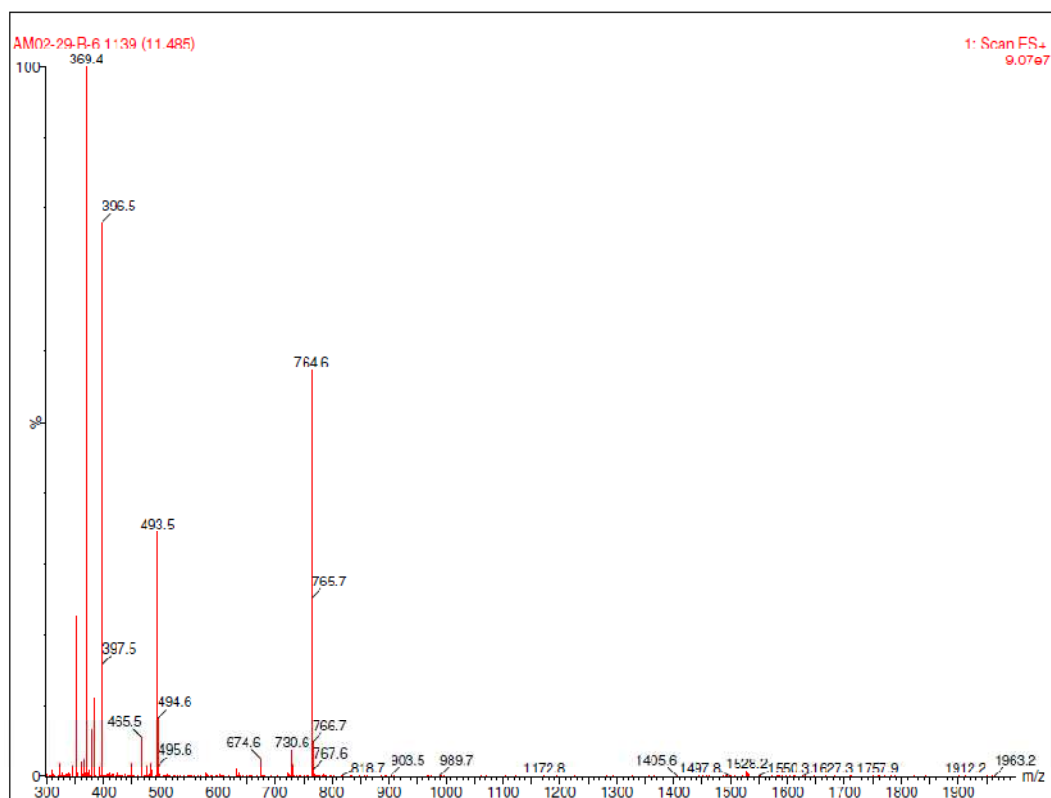
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

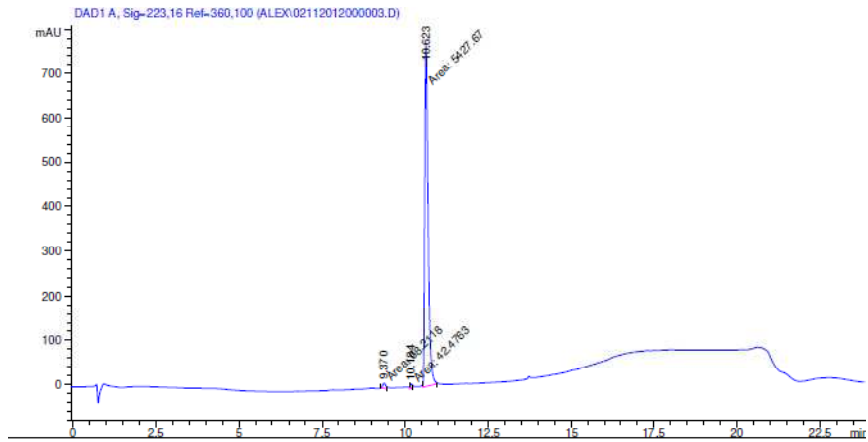
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.732	MM	0.0730	33.47158	7.63960	0.5920
2	10.293	MM	0.1262	5620.56396	742.39386	99.4080

Totals : 5654.03555 750.03346



P-Nle-P-Tyr(OBn)



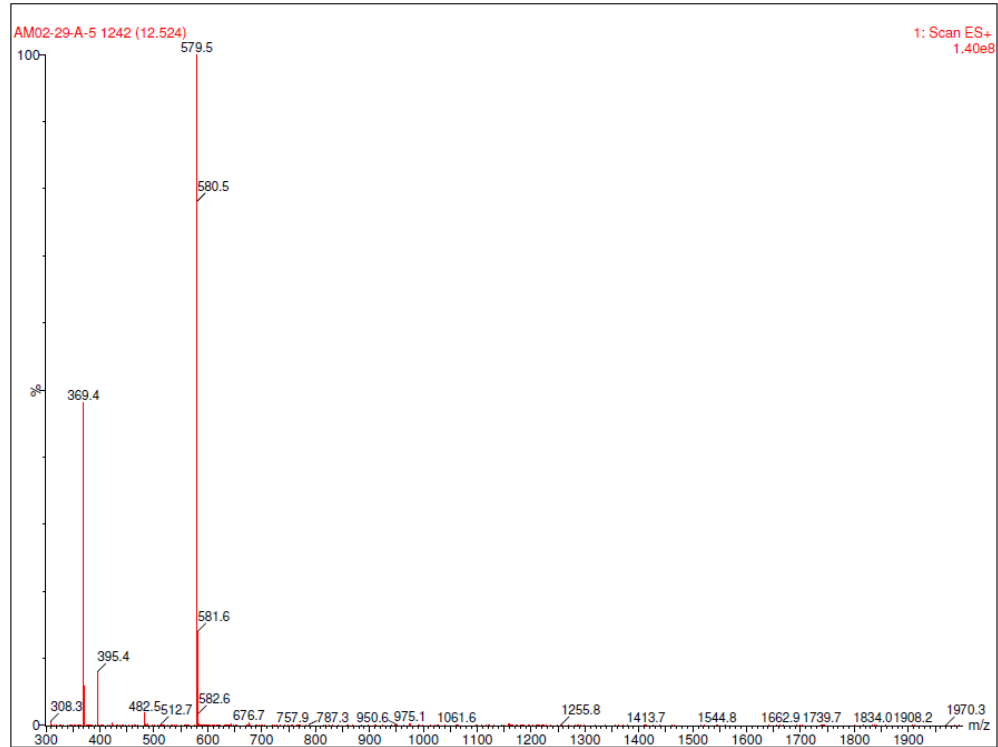
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

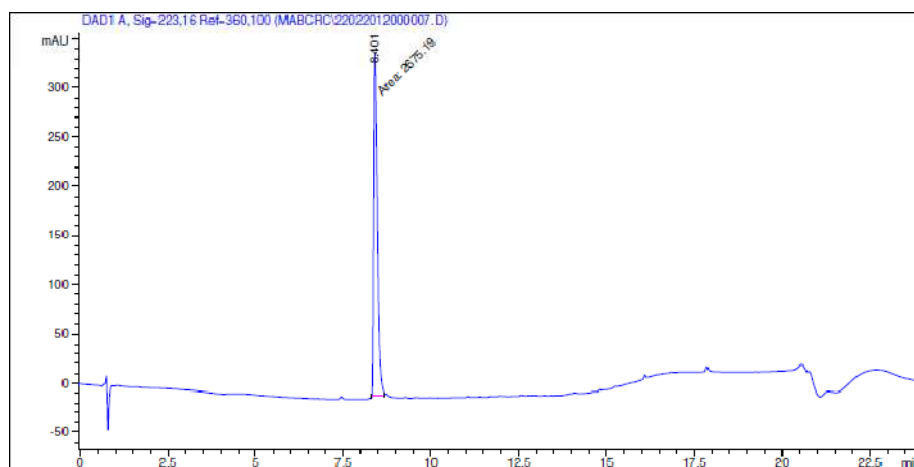
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.370	MM	0.0992	68.21181	11.46084	1.2316
2	10.184	MM	0.0801	42.47629	8.84359	0.7669
3	10.623	MM	0.1170	5427.66846	772.84888	98.0014

Totals : 5538.35656 793.15331



<Glu-R-P-R-L-S-(CH₂)₅-F



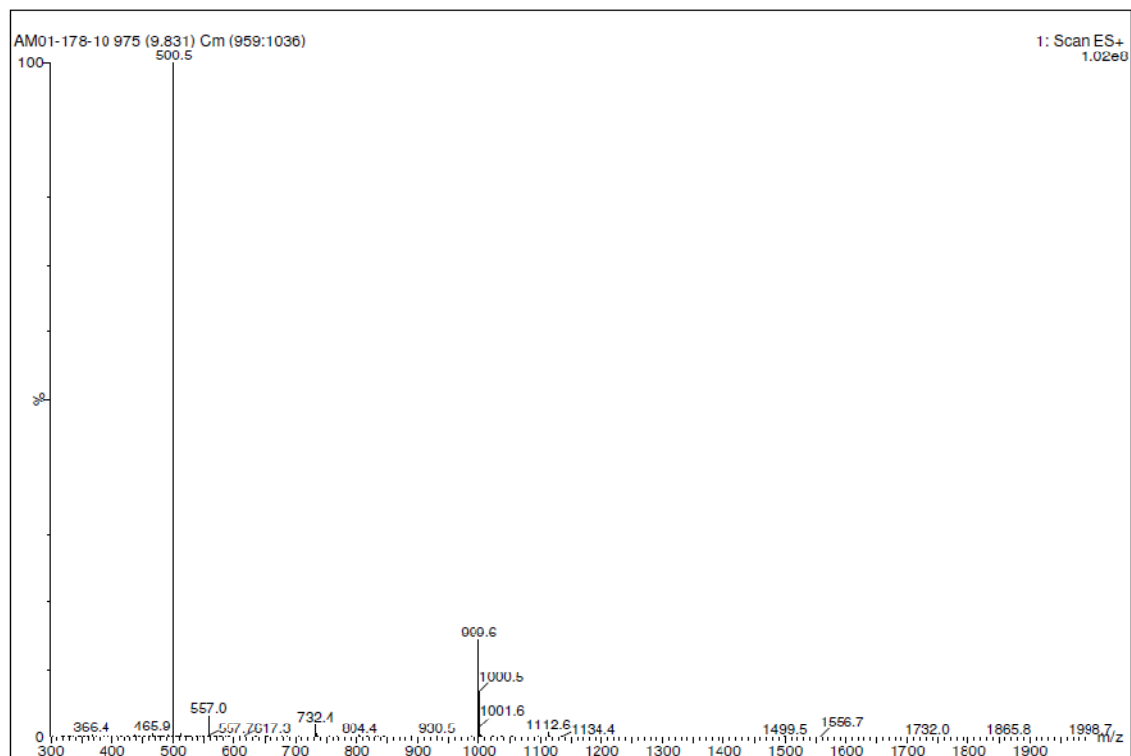
Area Percent Report

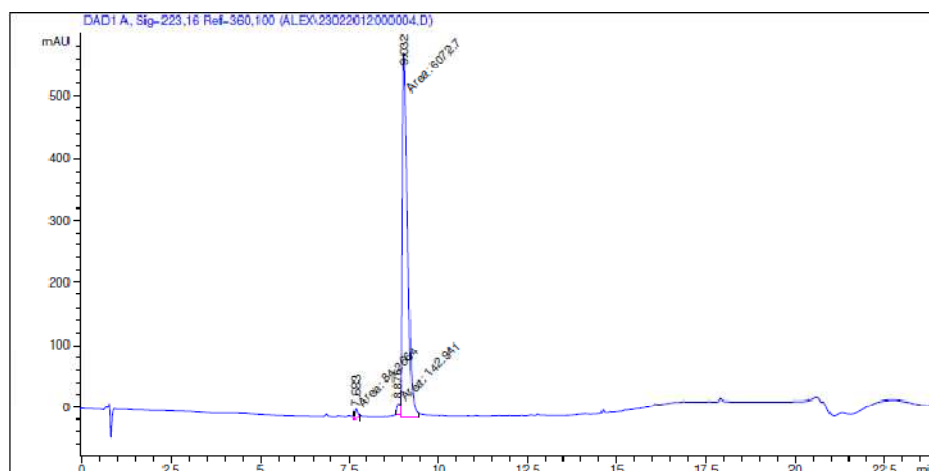
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.401	MM	0.1274	2675.19360	349.94806	100.0000

Totals : 2675.19360 349.94806



<Glu-R-P-R-L-S-(CH₂)₇-F

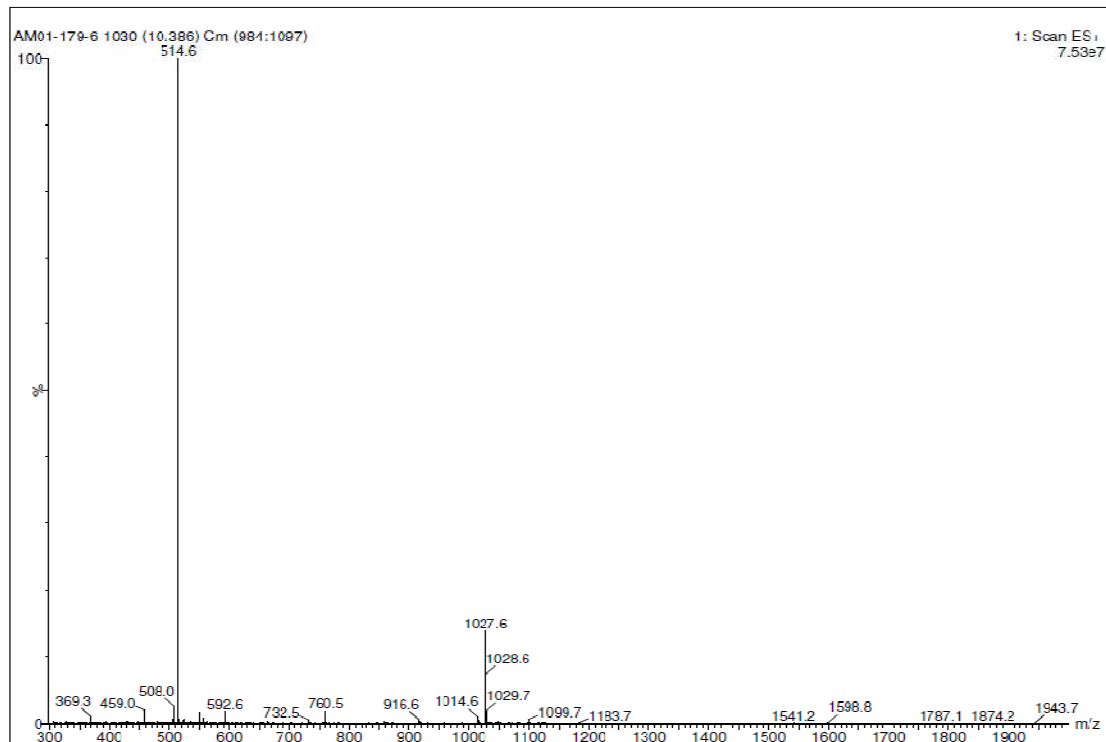
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

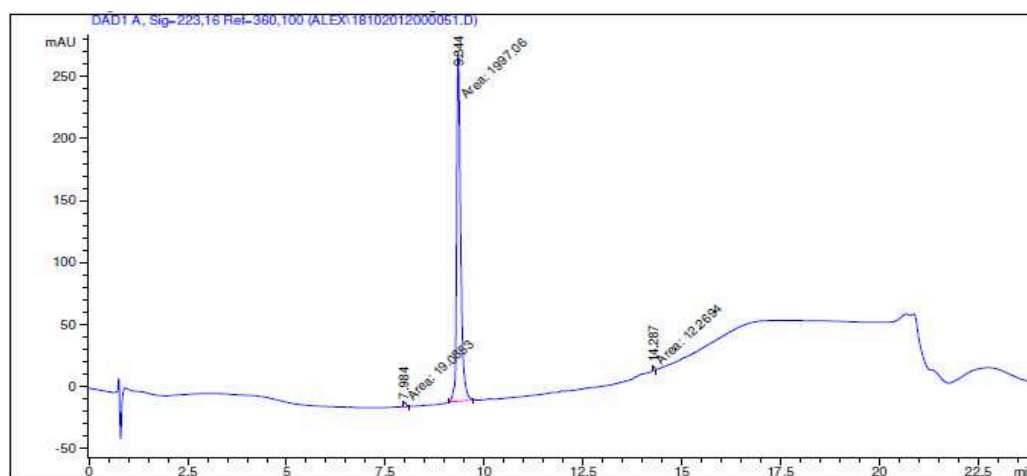
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.683	MM	0.0905	84.26639	15.52718	1.3376
2	8.876	MM	0.1179	142.94093	20.21397	2.2689
3	9.032	MM	0.1726	6072.70166	586.25769	96.3935

Totals : 6299.90898 621.99884



<Glu-R-P-R-L-S-(CH₂)₅-(CH₂)₅-F



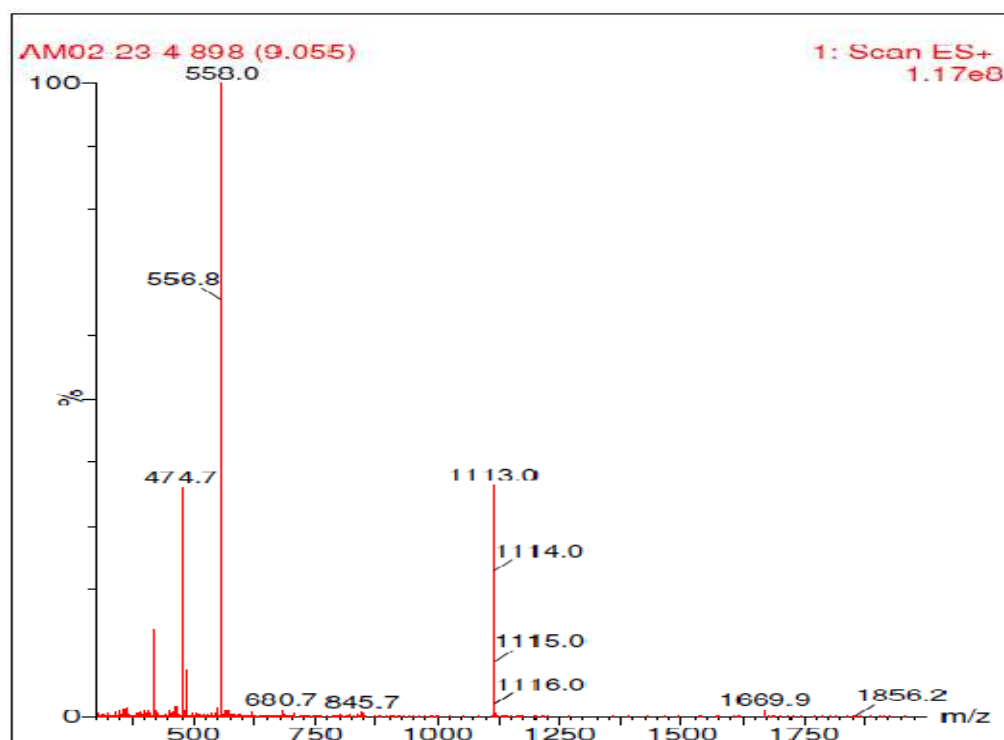
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

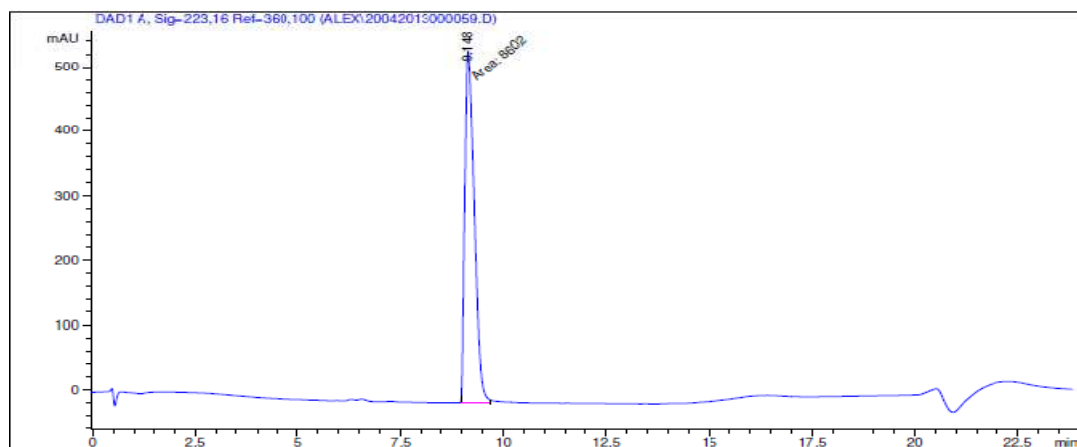
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.984	MM	0.0849	19.08530	3.74496	0.9409
2	9.344	MM	0.1184	1997.05701	281.00616	98.4542
3	14.287	MM	0.0554	12.26944	3.69243	0.6049

Totals : 2028.41174 288.44355



<Glu-R-P-R-L-S-(CH₂)₁₀-F



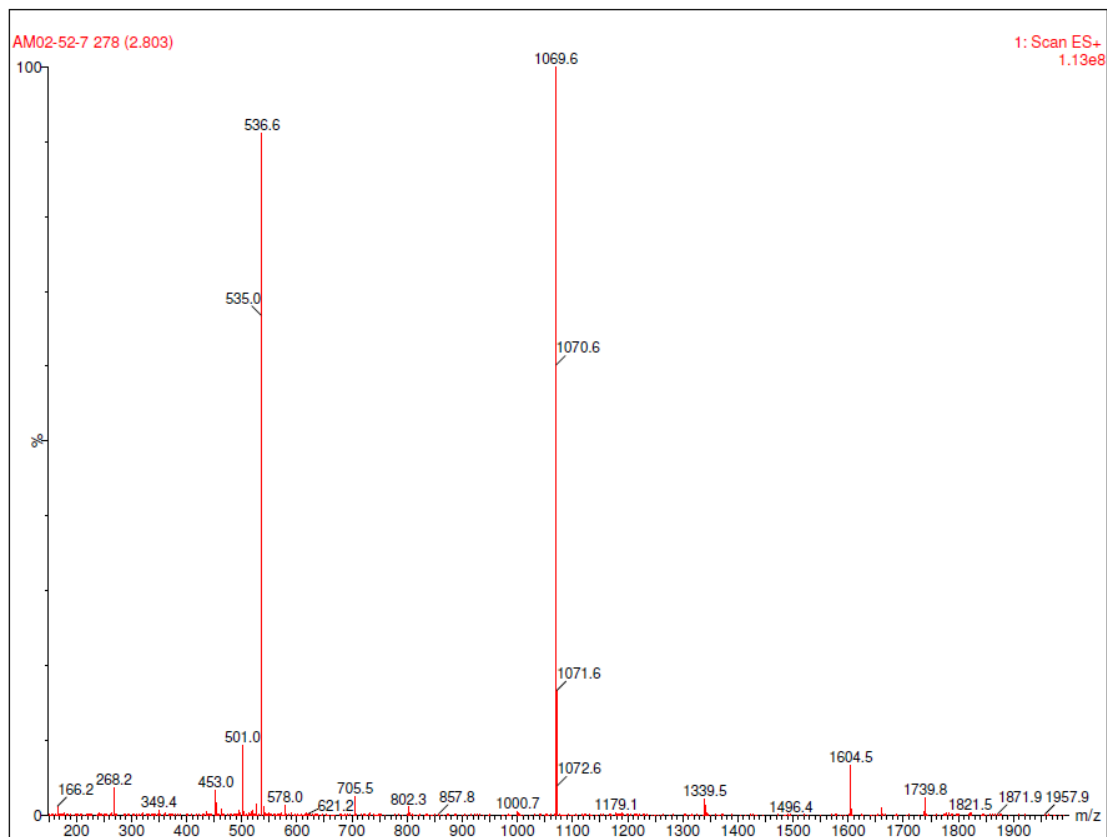
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

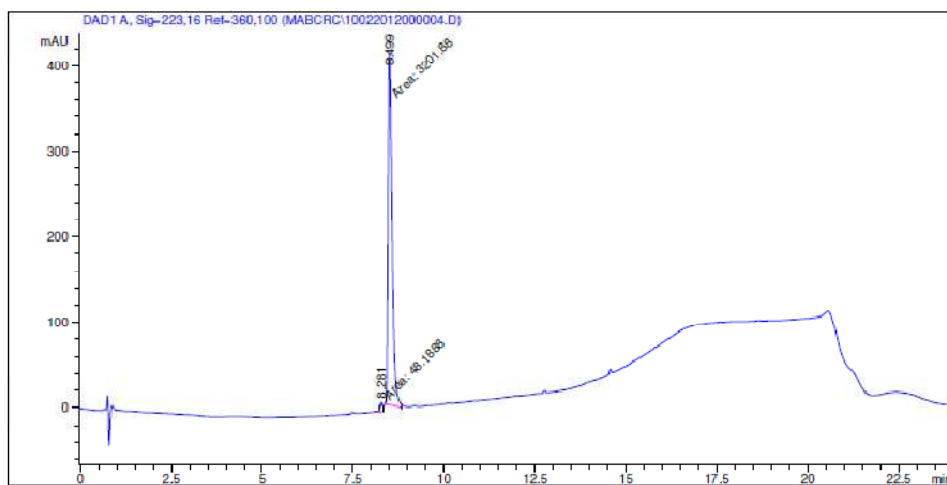
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.148	MM	0.2632	8602.00195	544.76648	100.0000

Totals : 8602.00195 544.76648



<Glu-R-P-R-F-S-H-K-G-P-Nle-P-F



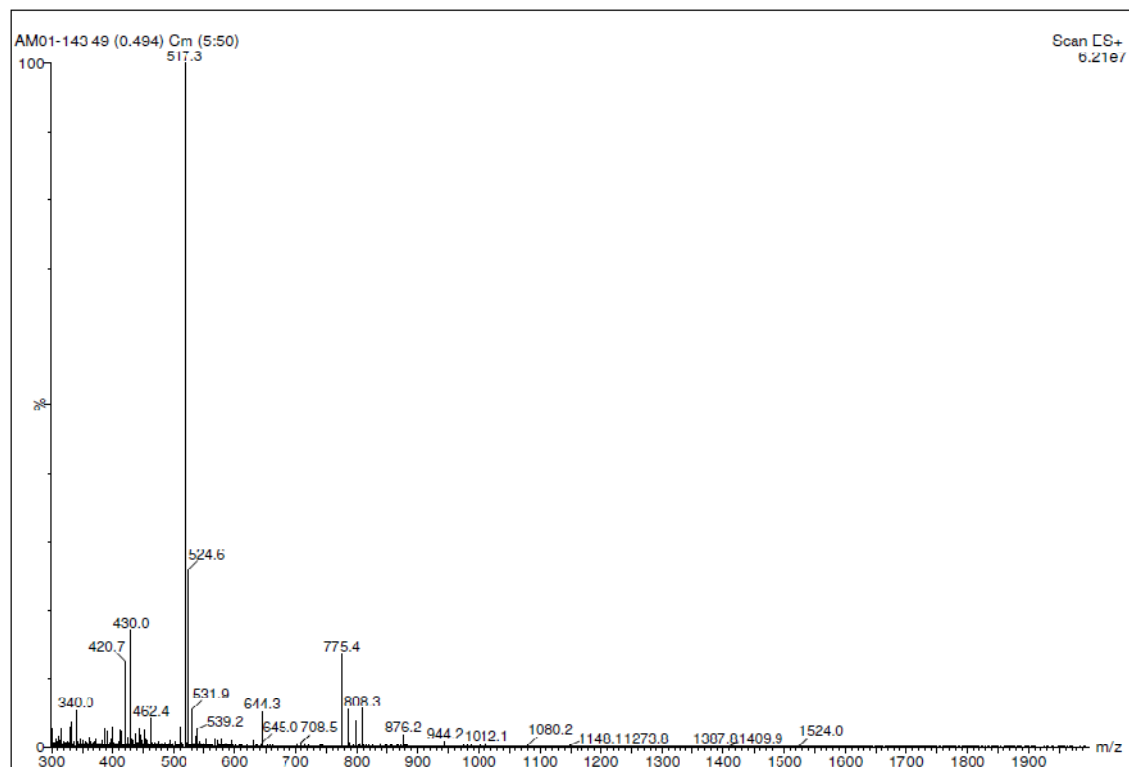
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

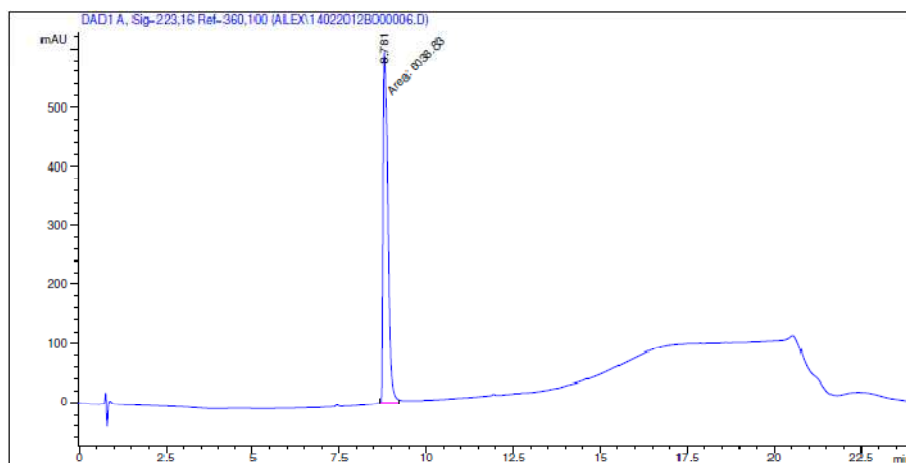
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.281	MM	0.0717	48.18882	11.20854	1.4827
2	8.499	MM	0.1297	3201.87622	411.53598	98.5173

Totals : 3250.06504 422.74452



<Glu-R-P-R-**Cha**-S-H-K-G-P-N**le**-P-F



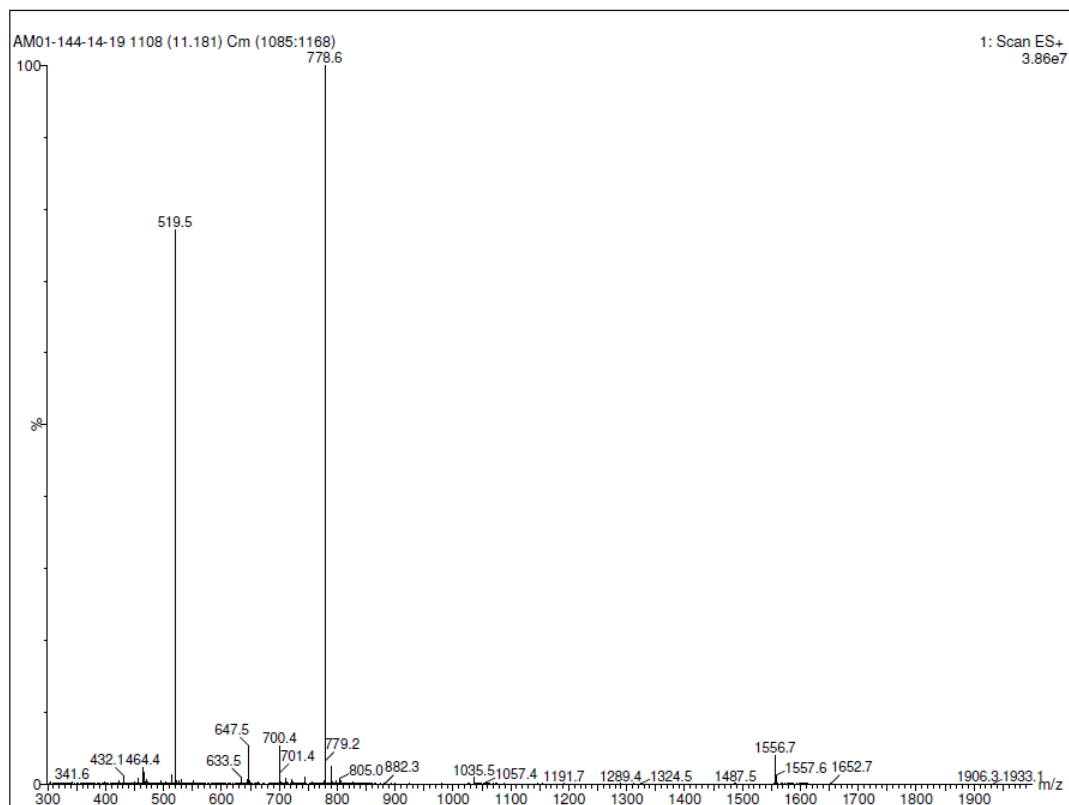
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

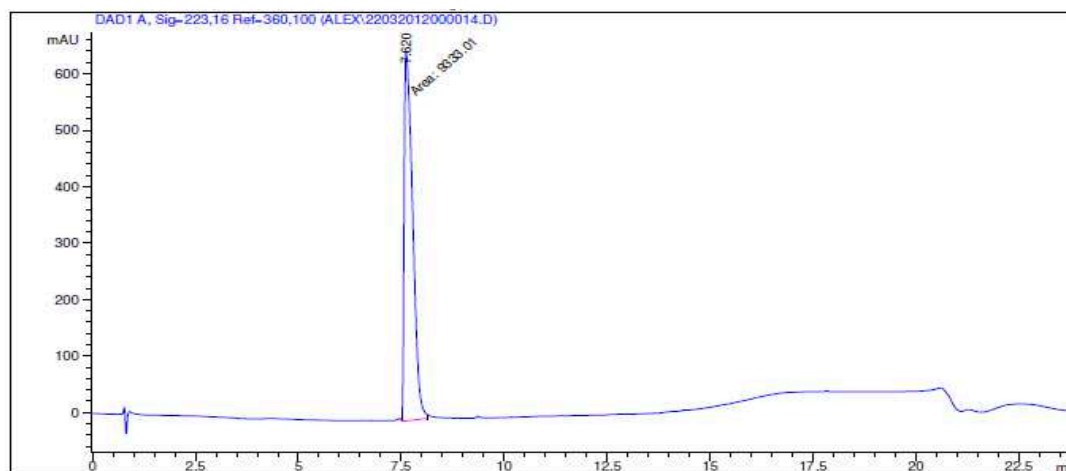
Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.781	MM	0.1692	6038.82520	594.80719	100.0000

Totals : 6038.82520 594.80719



<Glu-R-P-R-K-S-H-K-G-P-Nle-P-F



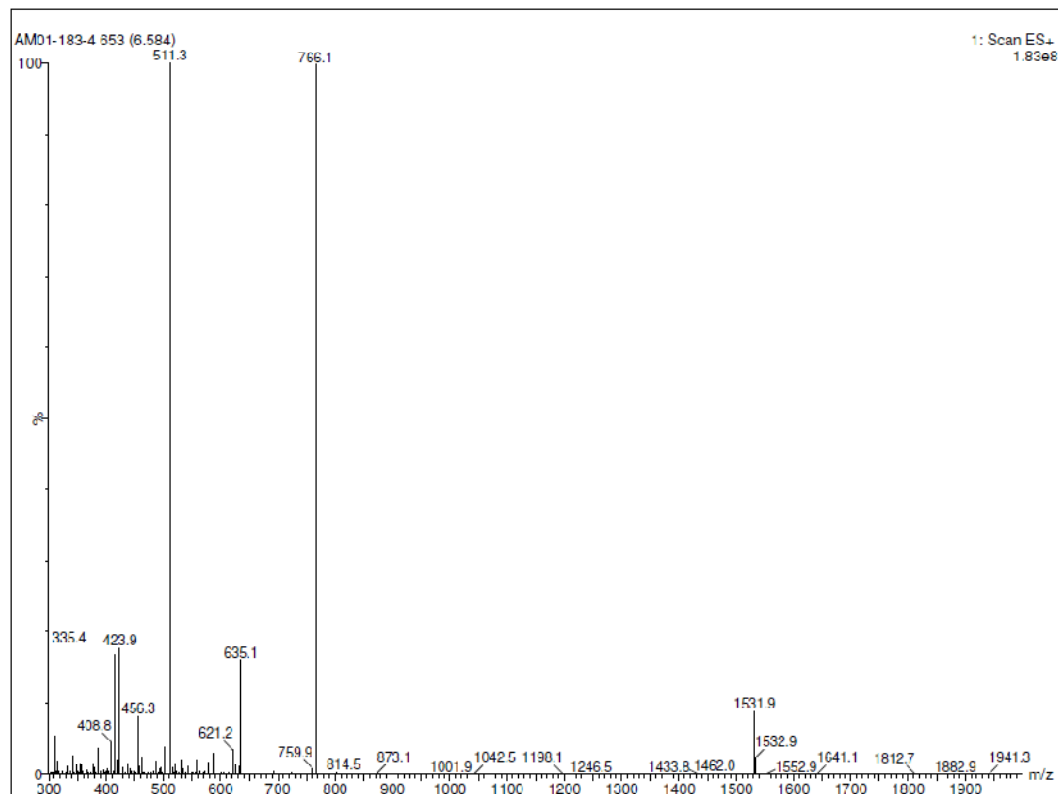
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

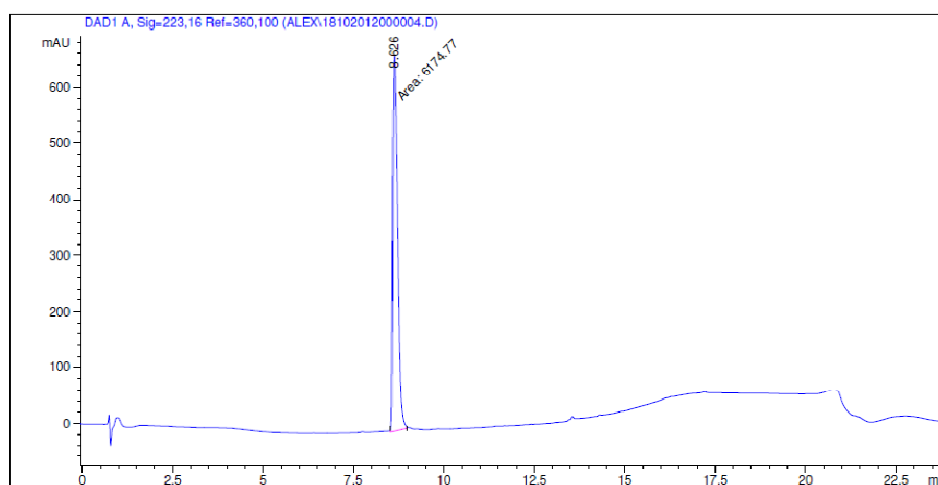
Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.620	MM	0.2381	9333.00781	653.37280	100.0000

Totals : 9333.00781 653.37280



<Glu-R-P-R-E-S-H-K-G-P-Nle-P-F



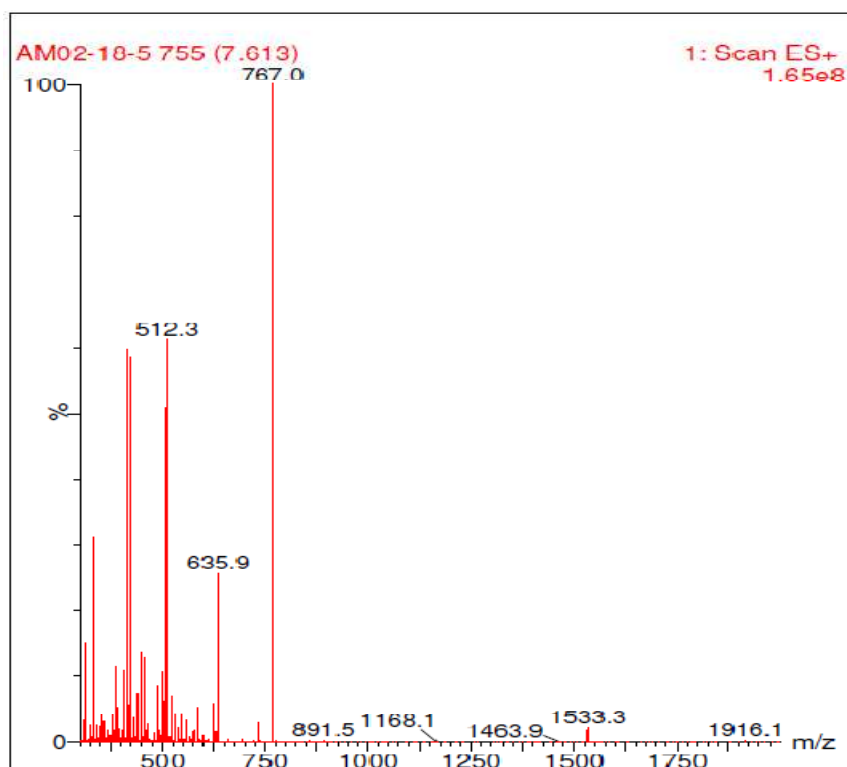
=====
Area Percent Report
=====

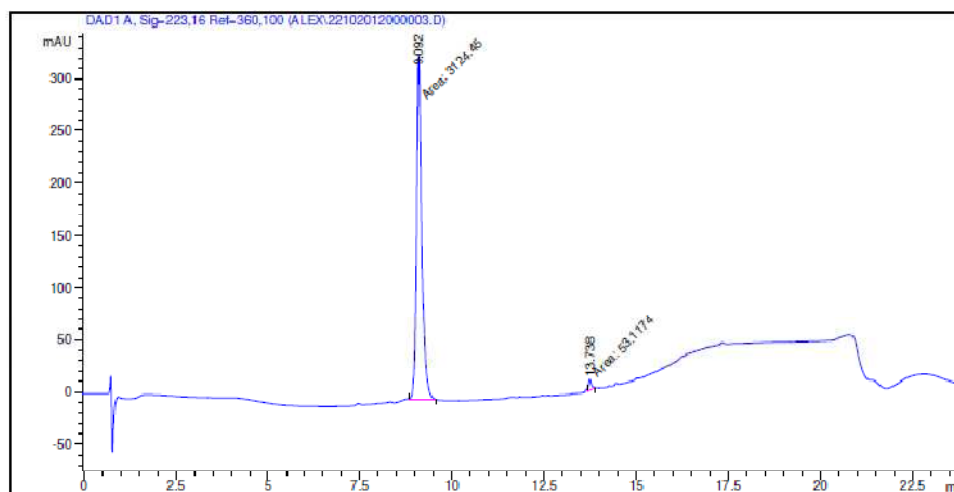
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.626	MM	0.1532	6174.77148	671.77777	100.0000

Totals : 6174.77148 671.77777



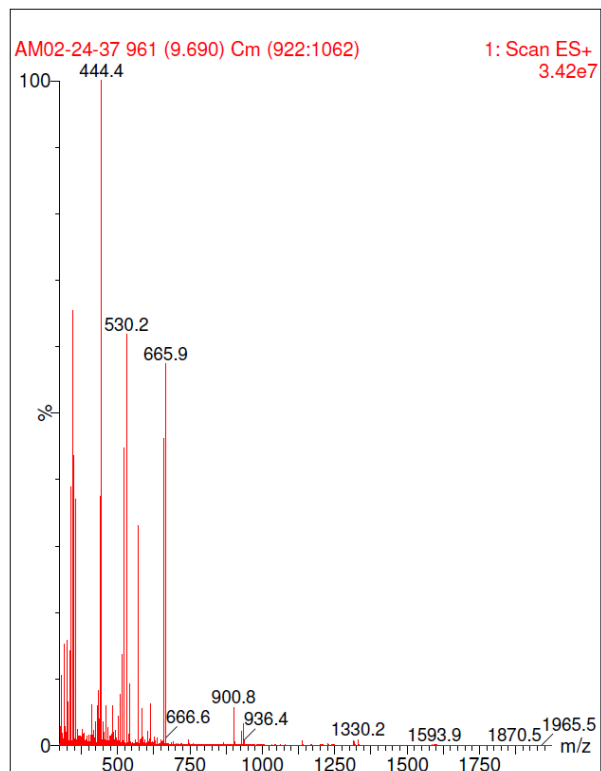
AM02-24: R-P-R-L-S-AllylGly-K-G-P-AllylGly-Tyr(OBn) (Macrocycle)


Area Percent Report

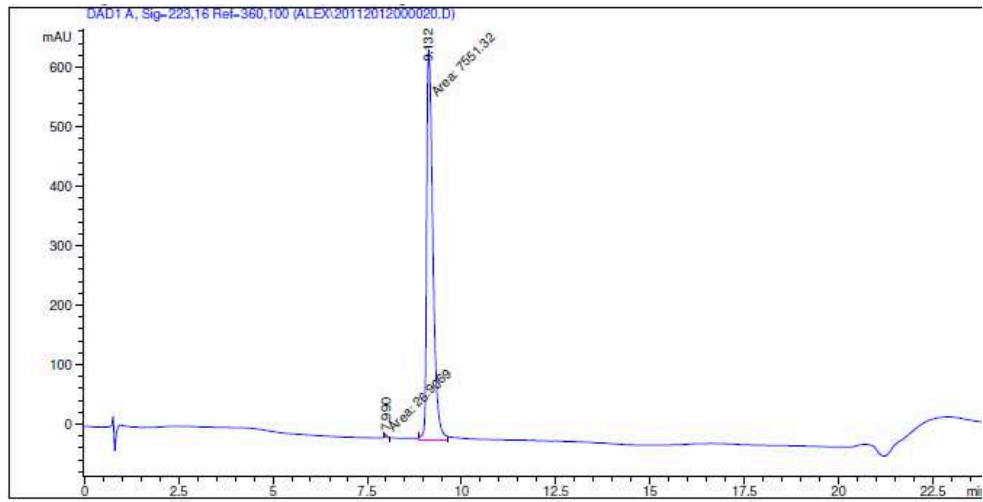
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.092	MM	0.1573	3124.45386	330.96475	98.3284
2	13.738	MM	0.0831	53.11736	10.65498	1.6716



AM02-33: R-P-R-L-S-AllyGly-K-G-Tyr(OBn)-P-AllylGly (Macrocycle)

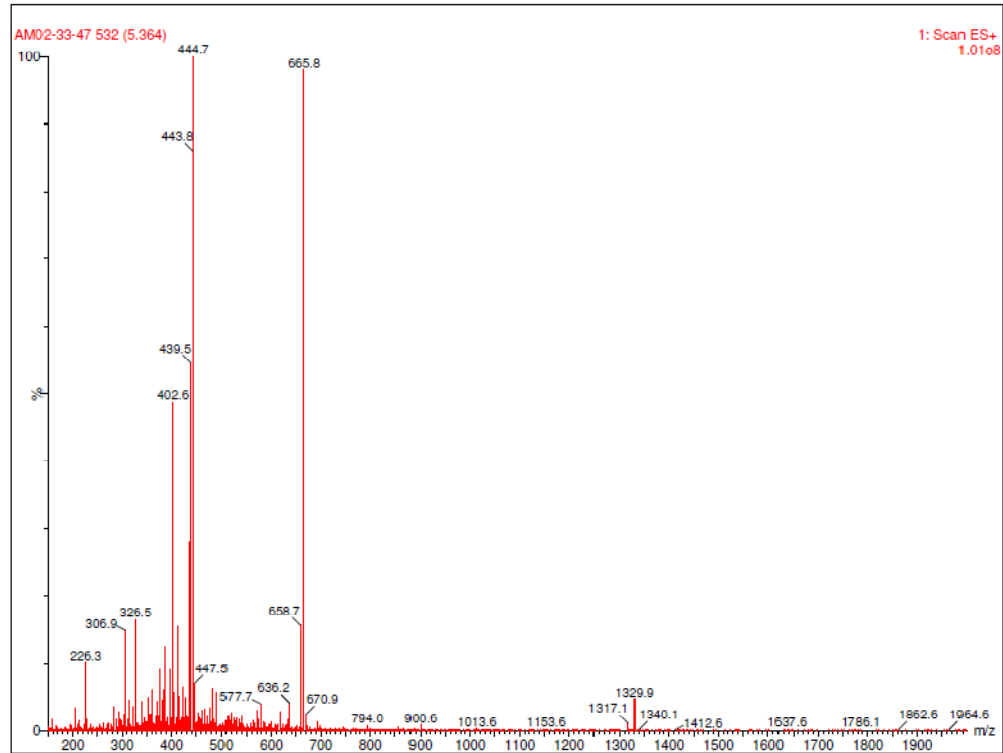


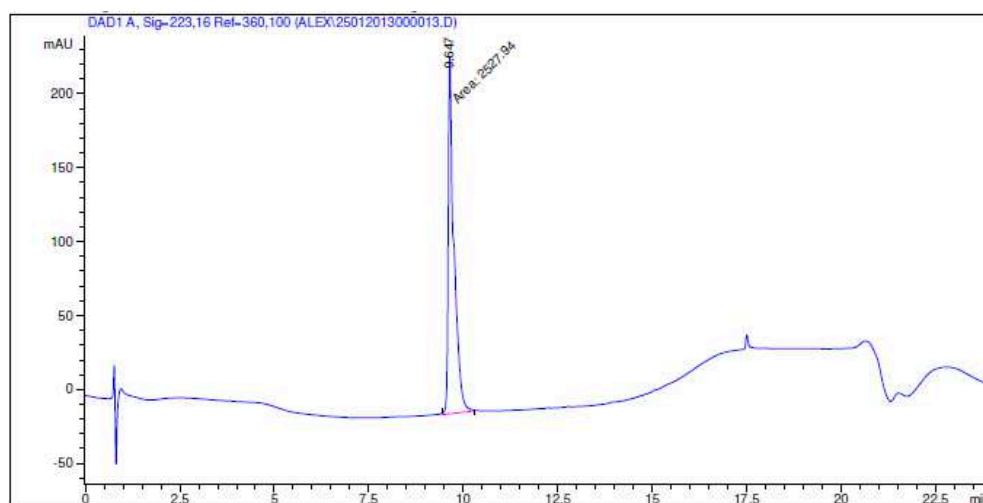
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.990	MM	0.0808	26.90690	5.55239	0.3551
2	9.132	MM	0.1918	7551.32227	656.20282	99.6449



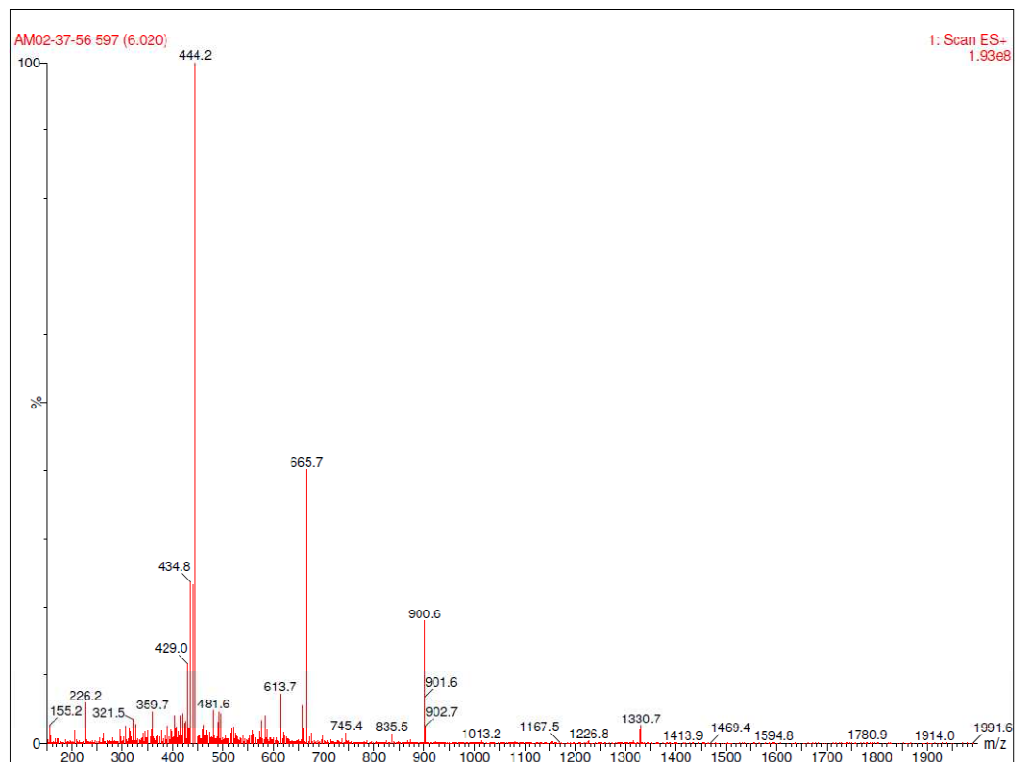
AM02-37: R-P-R-L-S-AllyGly-K-Tyr(OBn)-G-P-AllylGly (Macrocycle)

Area Percent Report

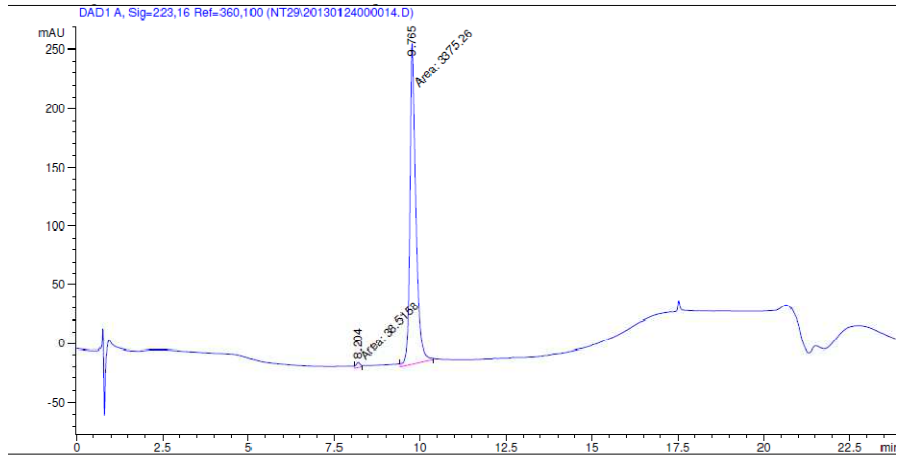
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.647	MM	0.1743	2527.93799	241.76709	100.0000



AM02-36: R-P-R-L-S-AllylGly-K-G-P-AllylGly-P-Tyr(OBn) (Macrocycle)

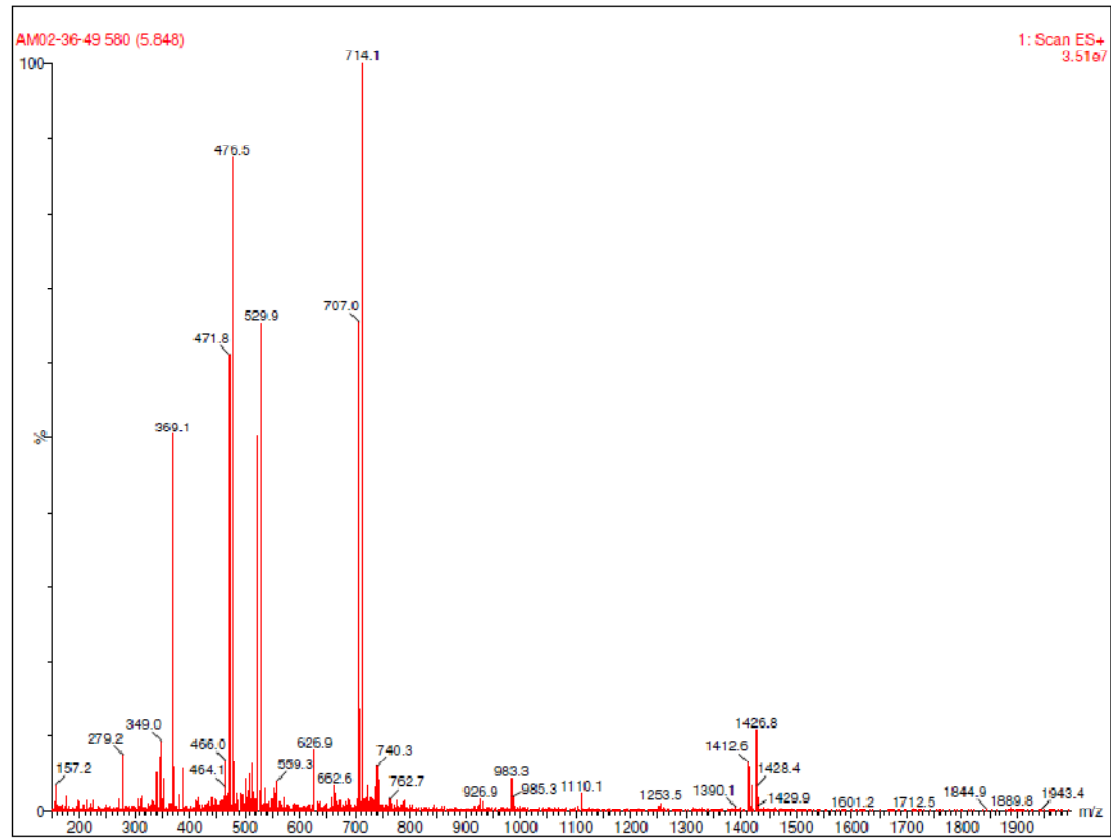


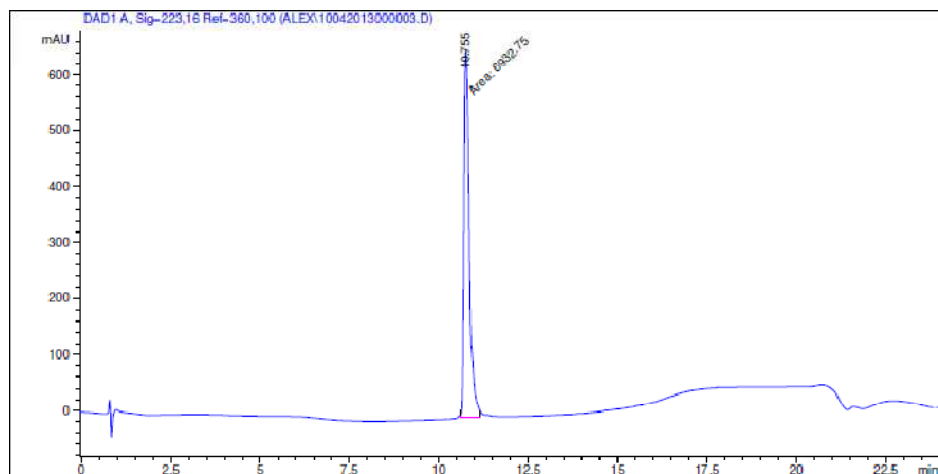
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.204	MM	0.1440	38.51580	4.45660	1.1282
2	9.765	MM	0.2065	3375.26050	272.45584	98.8718



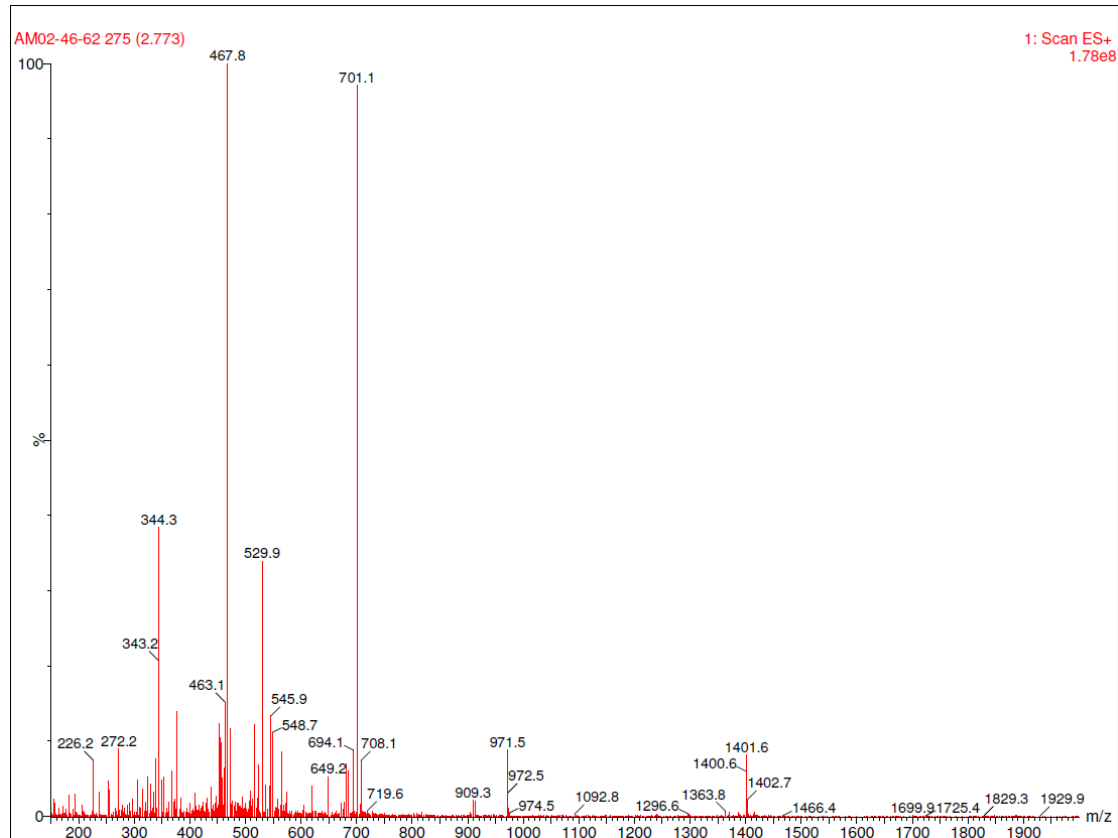
AM02-46: R-P-R-L-S-AllyGly-K-G-P-AllylGly- β -Ala-Tyr(OBn) (Macrocycle)

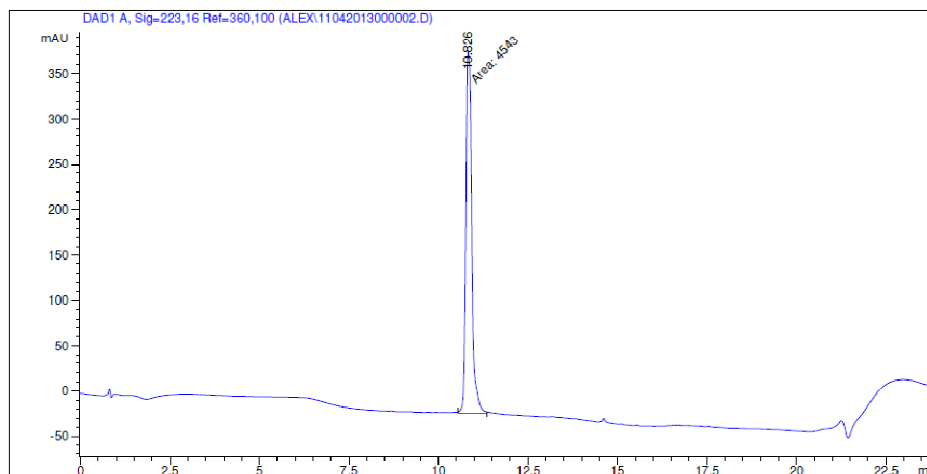
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	10.755	MM	0.1767	6932.75244	654.08435	100.0000



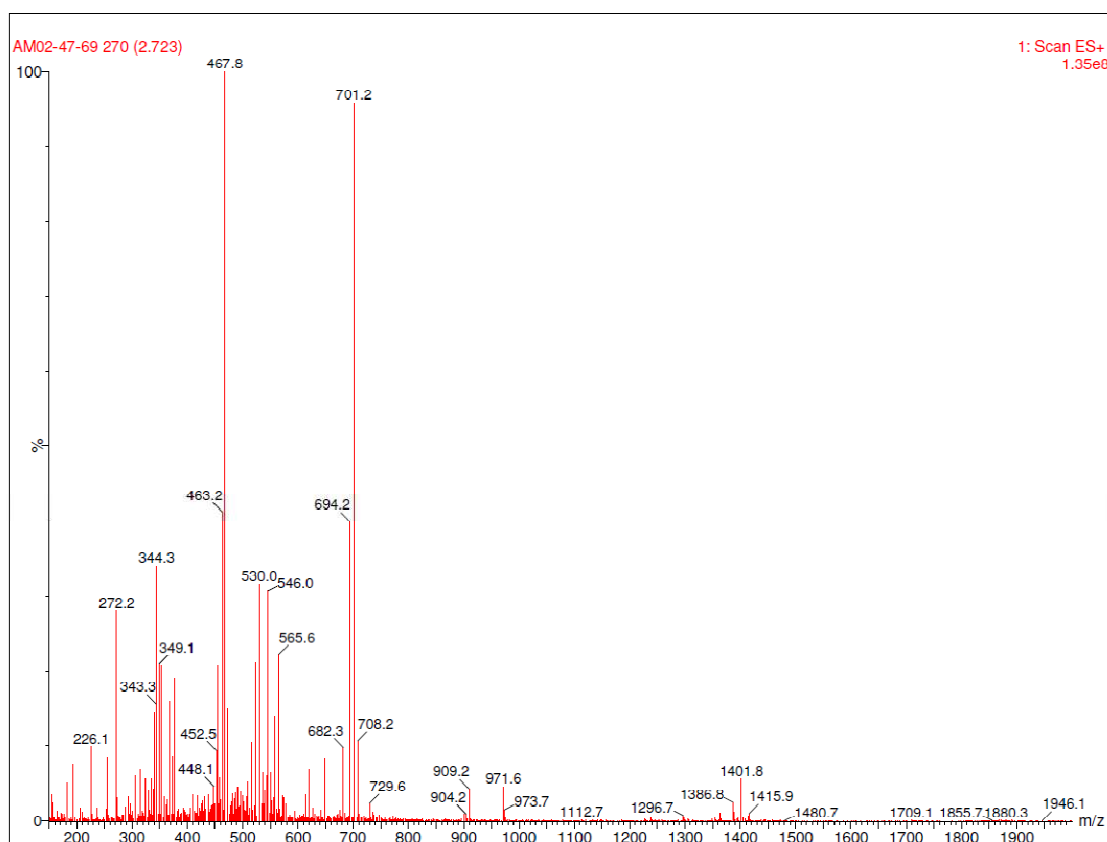
AM02-47: R-P-R-L-S-AllylGly-K-G-P-AllylGly-A-Tyr(OBn) (Macrocycle)

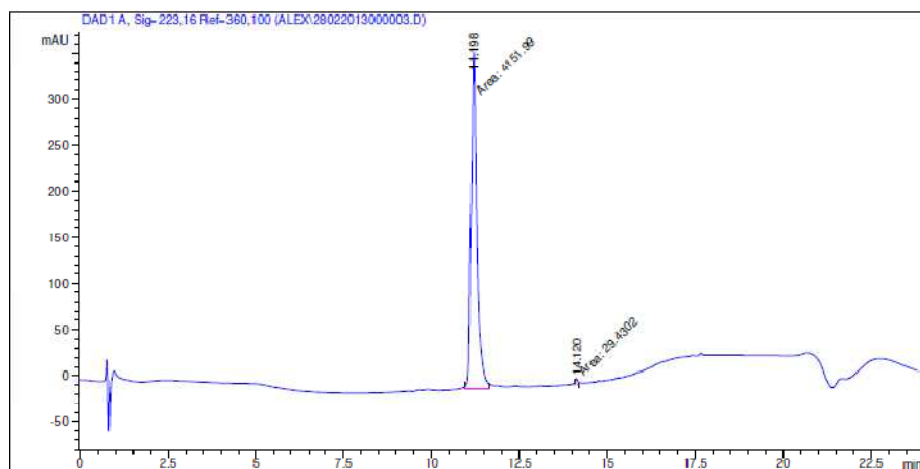
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	10.826	MM	0.1897	4543.00195	399.17548	100.0000



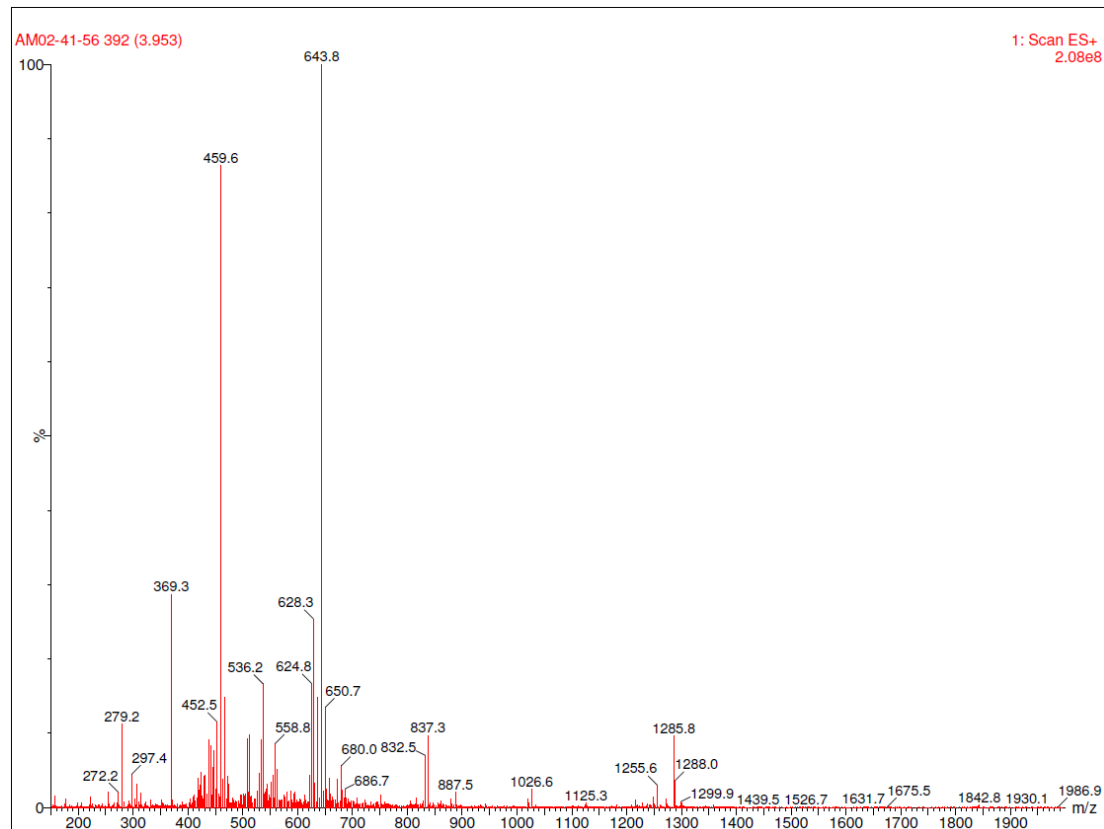
AM02-41: R-P-R-L-S-AllylGly-(CH₂)₇-AllylGly-P-Tyr(OBn) (Macrocycle)

Area Percent Report

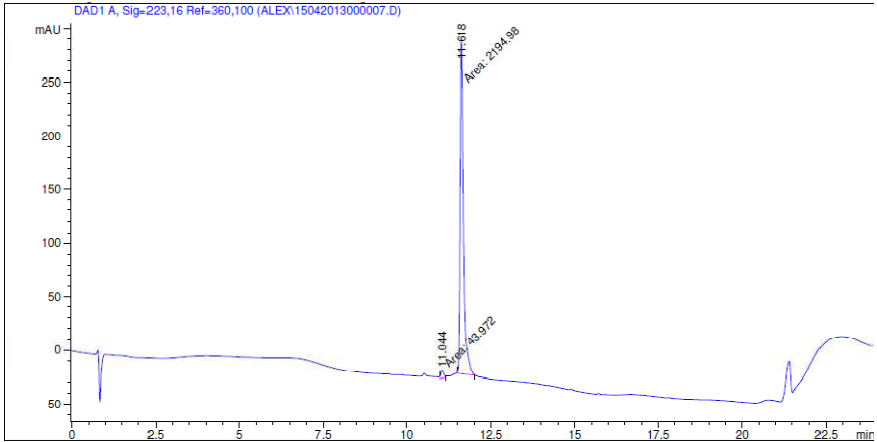
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.198	MM	0.1894	4151.98779	365.37491	99.2962
2	14.120	MM	0.0802	29.43024	6.11297	0.7038



AM02-48: R-P-R-L-S-AllyGly-β-Ala-β-Ala-AllylGly-P-Tyr(OBn) (Macrocycle)

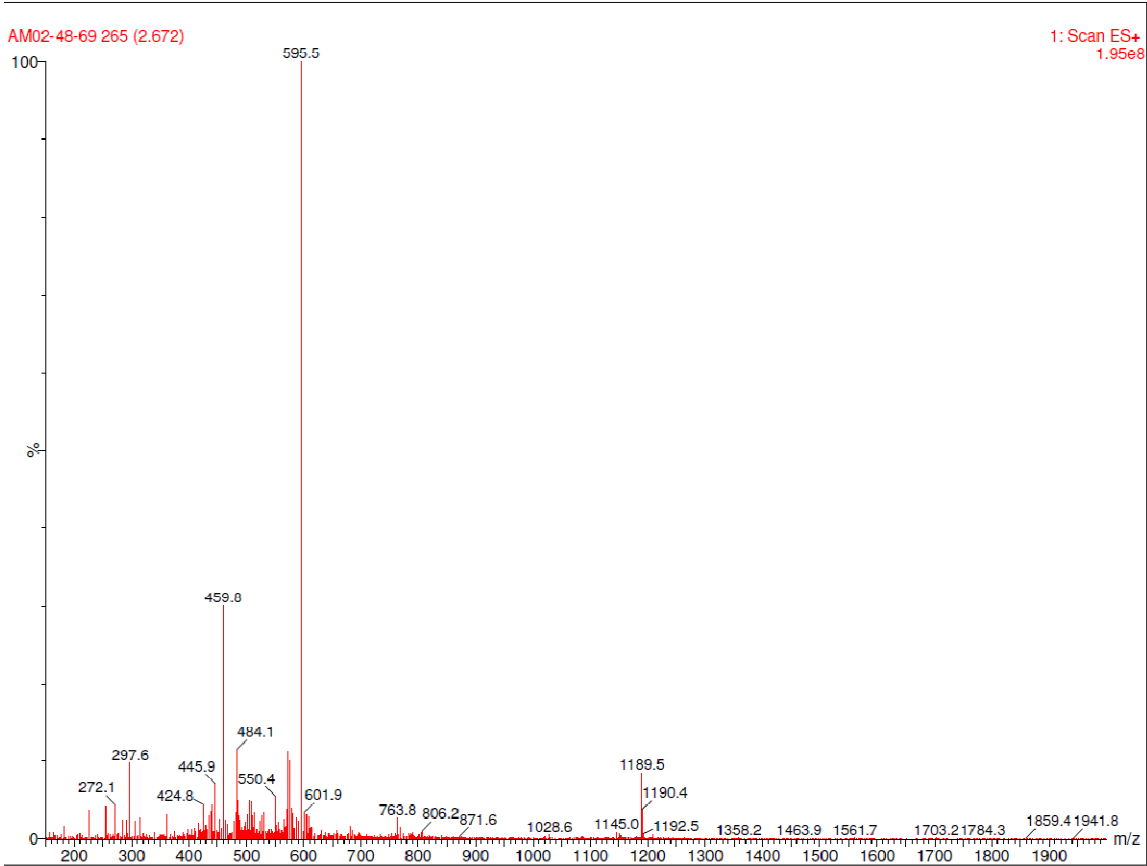


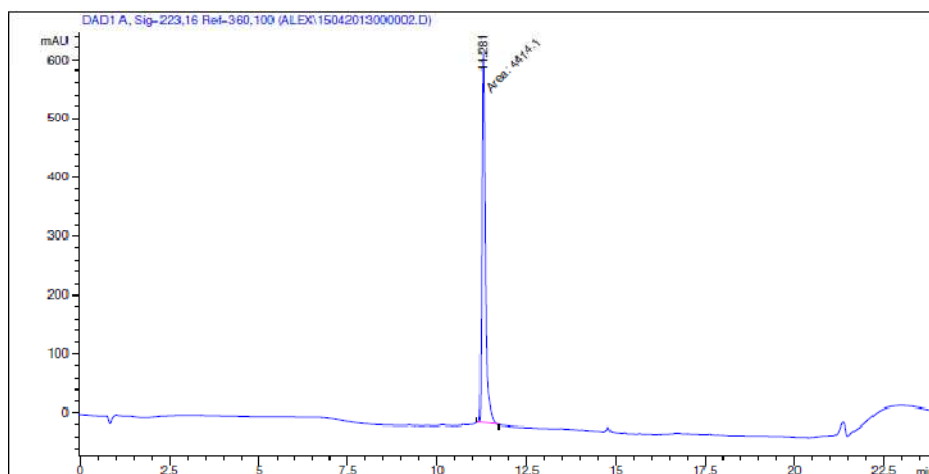
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.044	MM	0.0983	43.97203	7.45638	1.9640
2	11.618	MM	0.1175	2194.98486	311.33908	98.0360

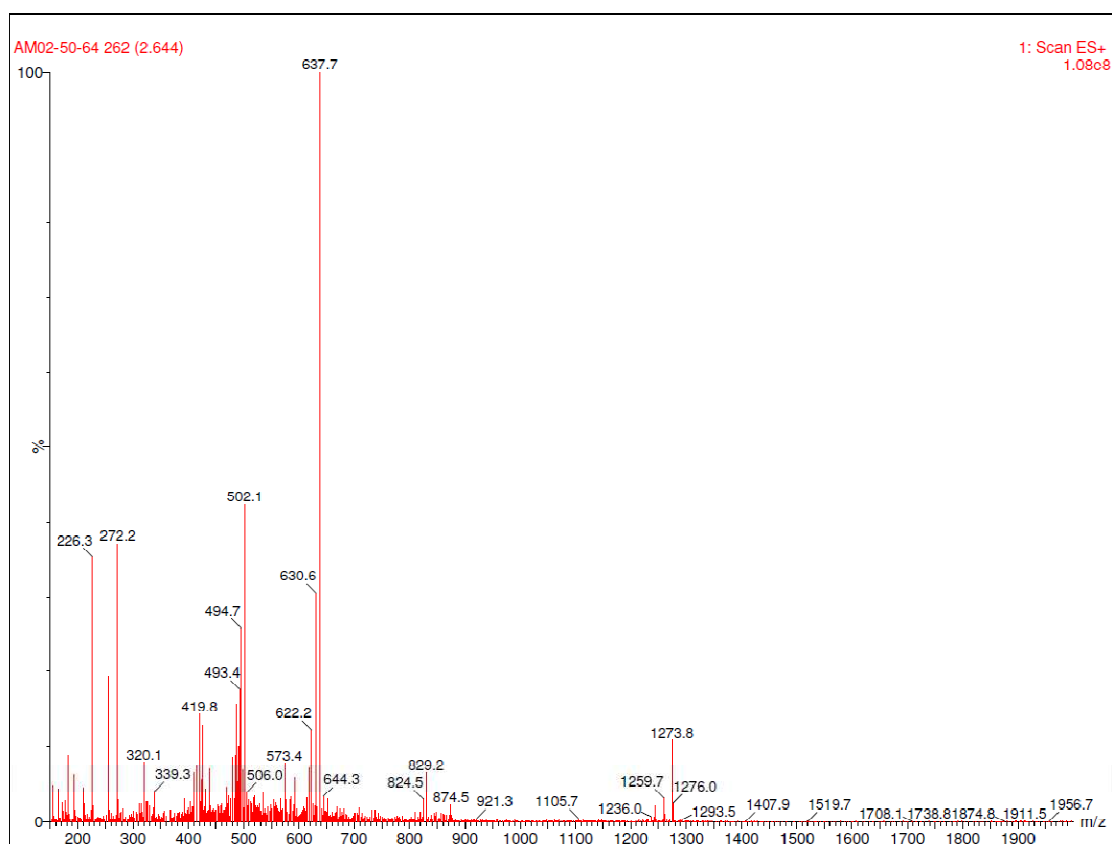


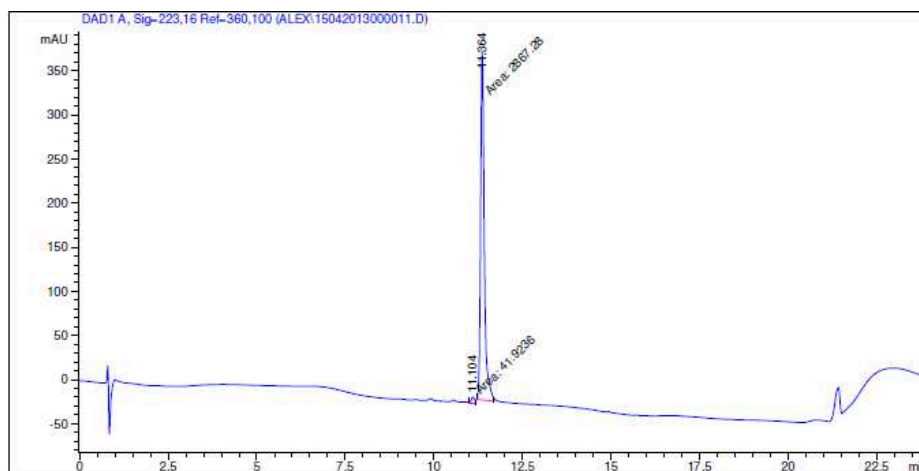
AM02-50: K-P-K-L-S-AllyGly-K-G-P-AllylGly-Tyr(OBn) (Macrocycle)**Area Percent Report**

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.281	MM	0.1171	4414.10254	628.41241	100.0000



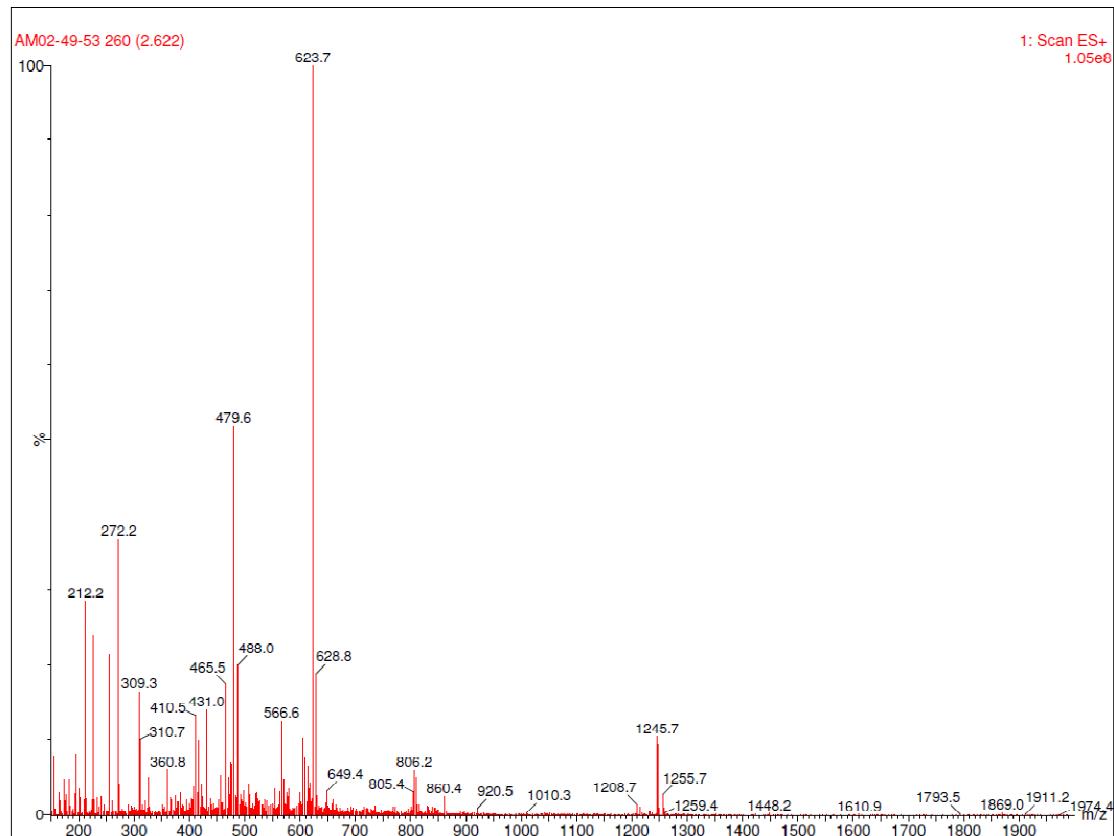
AM02-49: Orn-P-Orn-L-S-AllylGly-K-G-P-AllylGly-Tyr(OBn) (Macrocycle)

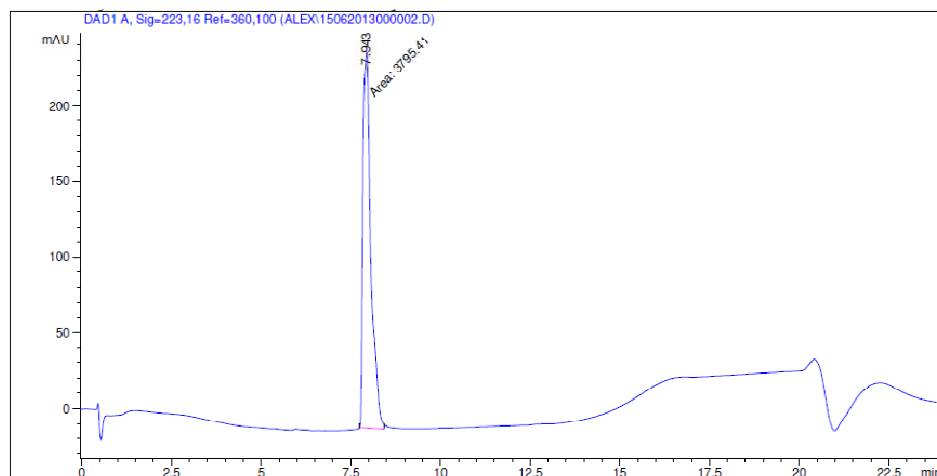
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	11.104	MM	0.1044	41.92359	6.69498	1.4411
2	11.364	MM	0.1208	2867.28271	395.73755	98.5589



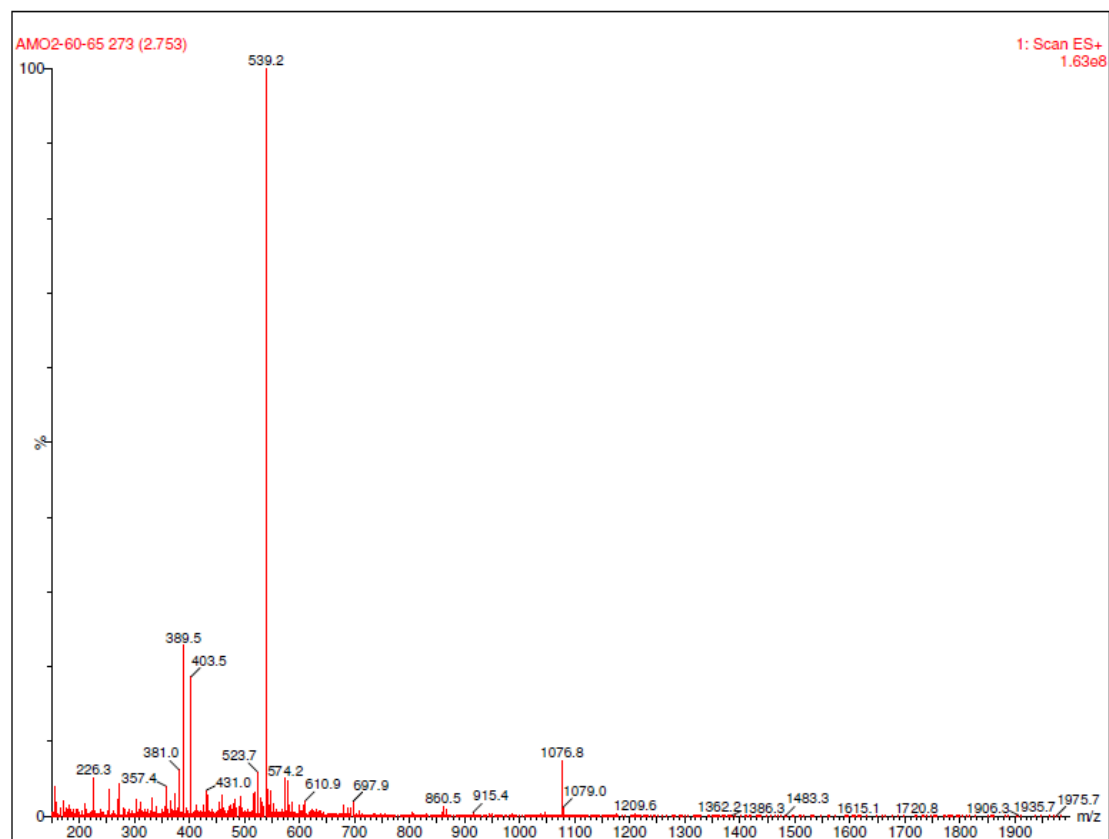
AM02-60: R-L-S-AllylGly-K-G-P-AllylGly-Tyr(OBn) (Macrocycle)

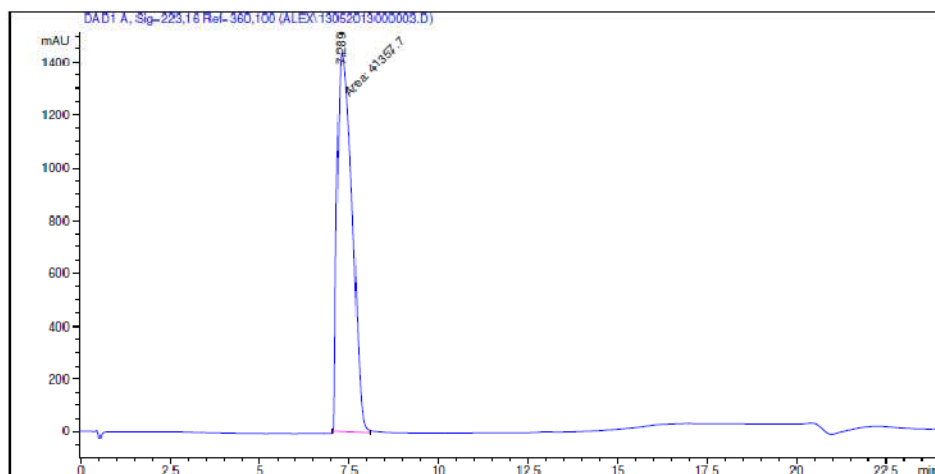
Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=223,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.943	MM	0.2547	3795.40942	248.39760	100.0000



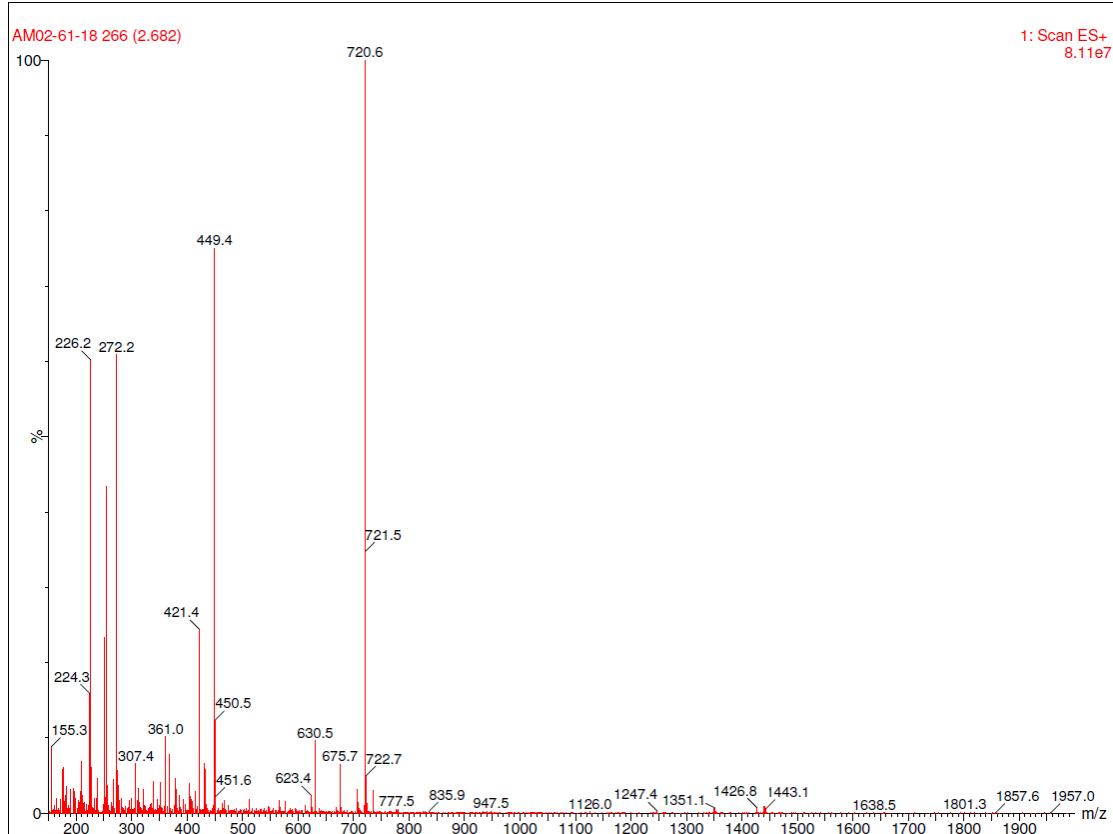
AM02-61: AllyGly-K-G-P-AllylGly-Tyr(OBn) (Macrocycle)

Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig-223,16 Ref-360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	7.289	MM	0.4797	4.13577e4	1437.03320	100.0000



BIBLIOGRAPHIE

Aaronson, D. S.; Horvath, C. M. A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT. *Science* **2002**, *296*, 1653–1655.

Adessi, C.; Soto, C. Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 963–978.

Angers, S.; Salahpour, a; Joly, E.; Hilairret, S.; Chelsky, D.; Dennis, M.; Bouvier, M. Detection of Beta 2-Adrenergic Receptor Dimerization in Living Cells Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 3684–3689.

Atluri, P.; Morine, K. J.; Liao, G. P.; Panlilio, C. M.; Berry, M. F.; Hsu, V. M.; Hiesinger, W.; Cohen, J. E.; Joseph Woo, Y. Ischemic Heart Failure Enhances Endogenous Myocardial Apelin and APJ Receptor Expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2007**, *12*, 127–138.

Audet, N.; Charfi, I.; Mnie-Filali, O.; Amraei, M.; Chabot-Doré, A.-J.; Millecamps, M.; Stone, L. S.; Pineyro, G. Differential Association of Receptor-G $\beta\gamma$ Complexes with B-arrestin2 Determines Recycling Bias and Potential for Tolerance of Δ Opioid Receptor Agonists. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 4827–4840.

Azizi, Y.; Faghihi, M.; Imani, A.; Roghani, M.; Nazari, A. Post-Infarct Treatment with [Pyr1]-Apelin-13 Reduces Myocardial Damage through Reduction of Oxidative Injury and Nitric Oxide Enhancement in the Rat Model of Myocardial Infarction. *Peptides* **2013**, *46*, 76–82.

Bai, B.; Tang, J.; Liu, H.; Chen, J.; Li, Y.; Song, W. Apelin-13 Induces ERK1/2 but Not p38 MAPK Activation through Coupling of the Human Apelin Receptor to the Gi2 Pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **2008**, *40*, 311–318.

Bai, B.; Cai, X.; Jiang, Y.; Karteris, E.; Chen, J. Heterodimerization of Apelin Receptor and Neurotensin Receptor 1 Induces Phosphorylation of ERK1/2 and Cell Proliferation via G α_q -Mediated Mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 2071–2081.

Barker, E. L.; Westphal, R. S.; Schmidt, D.; Sanders-Bush, E. Constitutively Active 5-hydroxytryptamine_{2C} Receptors Reveal Novel Inverse Agonist Activity of Receptor Ligands. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11687–11690.

Barnes, G. D.; Alam, S.; Carter, G.; Pedersen, C. M.; Lee, K. M.; Hubbard, T. J.; Veitch, S.; Jeong, H.; White, A.; Cruden, N. L.; et al. Sustained Cardiovascular Actions of APJ Agonism during Renin-Angiotensin System Activation and in Patients with Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **2013**, *6*, 482–491.

Befort, K.; Tabbara, L.; Kling, D.; Maigret, B.; Kieffer, B. L. Role of Aromatic Transmembrane Residues of the Delta-Opioid Receptor in Ligand Recognition. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10161–10168.

Befort, K.; Filliol, D.; Darcq, E.; Ghate, a; Matifas, a; Lardenois, a; Muller, J.; Thibault, C.; Dembele, D.; Poch, O.; et al. Gene Expression Is Altered in the Lateral Hypothalamus upon Activation of the Mu Opioid Receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1129*, 175–184.

Berry, M. F.; Pirololi, T. J.; Jayasankar, V.; Burdick, J.; Morine, K. J.; Gardner, T. J.; Woo, Y. J. Apelin Has in Vivo Inotropic Effects on Normal and Failing Hearts. *Circulation* **2004**, *110*, II187–II193.

Biringer, R. G.; Amato, H.; Harrington, M. G.; Fonteh, A. N.; Riggins, J. N.; Hühmer, A. F. R. Enhanced Sequence Coverage of Proteins in Human Cerebrospinal Fluid Using Multiple Enzymatic Digestion and Linear Ion Trap LC-MS/MS. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2006**, *5*, 144–153.

Birnbaumer, L. Expansion of Signal Transduction by G Proteins. The Second 15 Years or so: From 3 to 16 Alpha Subunits plus Betagamma Dimers. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 772–793.

Black, J. W.; Leff, P. Operational Models of Pharmacological Agonism. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1983**, *220*, 141–162.

Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: An Evolutionary Success. *EMBO J.* **1999**, *18*, 1723–1729.

Boden, G. Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **2011**, *18*, 139–143.

Boerrigter, G.; Soergel, D. G.; Violin, J. D.; Lark, M. W.; Burnett, J. C. TRV120027, a Novel B-Arrestin Biased Ligand at the Angiotensin II Type I Receptor, Unloads the Heart and Maintains Renal Function When Added to Furosemide in Experimental Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **2012**, *5*, 627–634.

Boucher, J.; Masri, B.; Daviaud, D.; Gesta, S.; Guigné, C.; Mazzucotelli, A.; Castan-Laurell, I.; Tack, I.; Knibiehler, B.; Carpéné, C.; et al. Apelin, a Newly Identified Adipokine up-Regulated by Insulin and Obesity. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1764–1771.

Boureux, A.; Vignal, E.; Faure, S.; Fort, P. Evolution of the Rho Family of Ras-like GTPases in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 203–216.

Bowers, R. R.; Festuccia, W. T. L.; Song, C. K.; Shi, H.; Migliorini, R. H.; Bartness, T. J. Sympathetic Innervation of White Adipose Tissue and Its Regulation of Fat Cell Number. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R1167–R1175.

Brailoiu, G. C.; Dun, S. L.; Yang, J.; Ohsawa, M.; Chang, J. K.; Dun, N. J. Apelin-Immunoreactivity in the Rat Hypothalamus and Pituitary. *Neurosci. Lett.* **2002**, 327, 193–197.

Brzostowski, J. a; Kimmel, a R. Signaling at Zero G: G-Protein-Independent Functions for 7-TM Receptors. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 291–297.

Buck, J.; Sinclair, M. L.; Schapal, L.; Cann, M. J.; Levin, L. R. Cytosolic Adenylyl Cyclase Defines a Unique Signaling Molecule in Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 79–84.

Burton, P. S.; Conradi, R. a; Ho, N. F.; Hilgers, a R.; Borchardt, R. T. How Structural Features Influence the Biomembrane Permeability of Peptides. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1336–1340.

Bustelo, X. R.; Sauzeau, V.; Berenjeno, I. M. GTP-Binding Proteins of the Rho/Rac Family: Regulation, Effectors and Functions in Vivo. *Bioessays* **2007**, 29, 356–370.

Cardullo, R. A. Theoretical Principles and Practical Considerations for Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods Cell Biol.* **2007**, 81, 479–494.

Carpéné, C.; Dray, C.; Attané, C.; Valet, P.; Portillo, M. P.; Churrua, I.; Milagro, F. I.; Castan-Laurell, I. Expanding Role for the apelin/APJ System in Physiopathology. *J. Physiol. Biochem.* **2007**, 63, 359–373.

Castan-Laurell, I.; Boucher, J.; Dray, C.; Daviaud, D.; Guigné, C.; Valet, P. Apelin, a Novel Adipokine over-Produced in Obesity: Friend or Foe? *Mol. Cell. Endocrinol.* **2005**, 245, 7–9.

Castan-Laurell, I.; Vítkova, M.; Daviaud, D.; Dray, C.; Kováčiková, M.; Kovacova, Z.; Hejnova, J.; Stich, V.; Valet, P. Effect of Hypocaloric Diet-Induced Weight Loss in Obese Women on Plasma Apelin and Adipose Tissue Expression of Apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol.* **2008**, 158, 905–910.

Castan-Laurell, I.; Dray, C.; Knauf, C.; Kunduzova, O.; Valet, P. Apelin, a Promising Target for Type 2 Diabetes Treatment? *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, 23, 234–241.

Ceraudo, E.; Galanth, C.; Carpentier, E.; Banegas-Font, I.; Schonegge, A.-M.; Alvear-Perez, R.; Iturrioz, X.; Bouvier, M.; Llorens-Cortes, C. Biased Signaling Favoring Gi over B-Arrestin Promoted by an Apelin Fragment Lacking the C-Terminal Phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 24599–24610.

Chamberland, C.; Barajas-Martinez, H.; Haufe, V.; Fecteau, M.-H.; Delabre, J.-F.; Burashnikov, A.; Antzelevitch, C.; Lesur, O.; Chraïbi, A.; Sarret, P.; et al. Modulation of Canine Cardiac Sodium Current by Apelin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, 48, 694–701.

Charles, C. J. Update on Apelin Peptides as Putative Targets for Cardiovascular Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 633–644.

Cheng, X.; Cheng, X. S.; Pang, C. C. Y. Venous Dilator Effect of Apelin, an Endogenous Peptide Ligand for the Orphan APJ Receptor, in Conscious Rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *470*, 171–175.

Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. a; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; et al. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human beta2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258–1265.

Chidiac, P.; Hebert, T. E.; Valiquette, M.; Dennis, M.; Bouvier, M. Inverse Agonist Activity of Beta-Adrenergic Antagonists. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 490–499.

Chien, E. Y. T.; Liu, W.; Zhao, Q.; Katritch, V.; Han, G. W.; Hanson, M. a; Shi, L.; Newman, A. H.; Javitch, J. a; Cherezov, V.; et al. Structure of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with a D2/D3 Selective Antagonist. *Science* **2010**, *330*, 1091–1095.

Chng, S. C.; Ho, L.; Tian, J.; Reversade, B. ELABELA: A Hormone Essential for Heart Development Signals via the Apelin Receptor. *Dev. Cell* **2013**, *27*, 672–680.

Choe, H.; Farzan, M.; Konkel, M.; Martin, K.; Sun, Y.; Marcon, L.; Cayabyab, M.; Berman, M.; Dorf, M. E.; Gerard, N.; et al. The Orphan Seven-Transmembrane Receptor Apj Supports the Entry of Primary T-Cell-Line-Tropic and Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6113–6118.

Choe, W.; Albright, A.; Sulcove, J.; Jaffer, S.; Hesselgesser, J.; Lavi, E.; Crino, P.; Kolson, D. L. Functional Expression of the Seven-Transmembrane HIV-1 Co-Receptor APJ in Neural Cells. *J. Neurovirol.* **2000**, *6 Suppl 1*, S61–S69.

Chong, K. S.; Gardner, R. S.; Morton, J. J.; Ashley, E. a; McDonagh, T. a. Plasma Concentrations of the Novel Peptide Apelin Are Decreased in Patients with Chronic Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* **2006**, *8*, 355–360.

Chu, J.; Zhang, H.; Huang, X.; Lin, Y.; Shen, T.; Chen, B.; Man, Y.; Wang, S.; Li, J. Apelin Ameliorates TNF-A-Induced Reduction of Glycogen Synthesis in the Hepatocytes through G Protein-Coupled Receptor APJ. *PLoS One* **2013**, *8*, e57231.

Chun, H. J.; Ali, Z. A.; Kojima, Y.; Kundu, R. K.; Sheikh, A. Y.; Agrawal, R.; Zheng, L.; Leeper, N. J.; Pearl, N. E.; Patterson, A. J.; et al. Apelin Signaling Antagonizes Ang II Effects in Mouse Models of Atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 3343–3354.

Clapham, D. E.; Neer, E. J. G Protein Beta Gamma Subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, *37*, 167–203.

Cox, C. M.; D'Agostino, S. L.; Miller, M. K.; Heimark, R. L.; Krieg, P. a. Apelin, the Ligand for the Endothelial G-Protein-Coupled Receptor, APJ, Is a Potent Angiogenic Factor Required for Normal Vascular Development of the Frog Embryo. *Dev. Biol.* **2006**, *296*, 177–189.

Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 448–455.

Cui, R.-R.; Mao, D.-A.; Yi, L.; Wang, C.; Zhang, X.-X.; Xie, H.; Wu, X.-P.; Liao, X.-B.; Zhou, H.; Meng, J.-C.; et al. Apelin Suppresses Apoptosis of Human Vascular Smooth Muscle Cells via APJ/PI3-K/Akt Signaling Pathways. *Amino Acids* **2010**, *39*, 1193–1200.

D'Aniello, C.; Lonardo, E.; Iaconis, S.; Guardiola, O.; Liguoro, A. M.; Liguori, G. L.; Autiero, M.; Carmeliet, P.; Minchiotti, G. G Protein-Coupled Receptor APJ and Its Ligand Apelin Act Downstream of Cripto to Specify Embryonic Stem Cells toward the Cardiac Lineage through Extracellular Signal-Regulated kinase/p70S6 Kinase Signaling Pathway. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 231–238.

Devic, E.; Rizzoti, K.; Bodin, S.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. Amino Acid Sequence and Embryonic Expression of Msr/apj, the Mouse Homolog of Xenopus X-Msr and Human APJ. *Mech. Dev.* **1999**, *84*, 199–203.

DeWire, S. M.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K. Beta-Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 483–510.

DeWire, S. M.; Yamashita, D. S.; Rominger, D. H.; Liu, G.; Cowan, C. L.; Graczyk, T. M.; Chen, X.-T.; Pitis, P. M.; Gotchev, D.; Yuan, C.; et al. A G Protein-Biased Ligand at the M-Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *344*, 708–717.

Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robison, K.; Jeyaseelan, R.; et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ. Res.* **2000**, *87*, E1–E9.

Dorn, G. W. GRK Mythology: G-Protein Receptor Kinases in Cardiovascular Disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. **2009**, *87*, 455–463.

Dray, C.; Knauf, C.; Daviaud, D.; Waget, A.; Boucher, J.; Buléon, M.; Cani, P. D.; Attané, C.; Guigné, C.; Carpené, C.; et al. Apelin Stimulates Glucose Utilization in Normal and Obese Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* **2008**, *8*, 437–445.

Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. The Exploration of Macrocycles for Drug Discovery--an Underexploited Structural Class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 608–624.

Duparc, T.; Colom, A.; Cani, P. D.; Massaly, N.; Rastrelli, S.; Drougard, A.; Le Gonidec, S.; Moulédous, L.; Frances, B.; Leclercq, I.; et al. Central Apelin Controls Glucose Homeostasis via a Nitric Oxide-Dependent Pathway in Mice. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1477–1496.

Edinger, A. L.; Hoffman, T. L.; Sharron, M.; Lee, B.; Yi, Y.; Choe, W.; Kolson, D. L.; Mitrovic, B.; Zhou, Y.; Faulds, D.; et al. An Orphan Seven-Transmembrane Domain Receptor Expressed Widely in the Brain Functions as a Coreceptor for Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* **1998**, *72*, 7934–7940.

Ehrhardt, C.; Schmolke, M.; Matzke, A.; Knoblauch, A.; Will, C.; Wixler, V.; Ludwig, S. Polyethylenimine, a Cost-Effective Transfection Reagent. *Signal Transduct.* **2006**, *6*, 179–184.

Ehrlich, A. T.; Furuyashiki, T.; Kitaoka, S.; Kakizuka, A.; Narumiya, S. Prostaglandin E Receptor EP1 Forms a Complex with Dopamine D1 Receptor and Directs D1-Induced cAMP Production to Adenylyl Cyclase 7 through Mobilizing G($\beta\gamma$) Subunits in Human Embryonic Kidney 293T Cells. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84*, 476–486.

Evans, N. A.; Groarke, D. A.; Warrack, J.; Greenwood, C. J.; Dodgson, K.; Milligan, G.; Wilson, S. Visualizing Differences in Ligand-Induced Beta-Arrestin-GFP Interactions and Trafficking between Three Recently Characterized G Protein-Coupled Receptors. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 476–485.

Eyries, M.; Siegfried, G.; Ciumas, M.; Montagne, K.; Agrapart, M.; Lebrin, F.; Soubrier, F. Hypoxia-Induced Apelin Expression Regulates Endothelial Cell Proliferation and Regenerative Angiogenesis. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 432–440.

Falcão-Pires, I.; Ladeiras-Lopes, R.; Leite-Moreira, A. F. The Apelinergic System: A Promising Therapeutic Target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 633–645.

De Falco, M.; De Luca, L.; Onori, N.; Cavallotti, I.; Artigiano, F.; Esposito, V.; De Luca, B.; Laforgia, V.; Groeger, A. M.; De Luca, A. Apelin Expression in Normal Human Tissues. *In Vivo* **2002**, *16*, 333–336.

Fan, X.; Zhou, N.; Zhang, X.; Mukhtar, M.; Lu, Z.; Fang, J.; DuBois, G. C.; Pomerantz, R. J. Structural and Functional Study of the Apelin-13 Peptide, an Endogenous Ligand of the HIV-1 Coreceptor, APJ. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10163–10168.

Ferguson, S. S.; Zhang, J.; Barak, L. S.; Caron, M. G. Molecular Mechanisms of G Protein-Coupled Receptor Desensitization and Resensitization. *Life Sci.* **1998**, *62*, 1561–1565.

Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.

Fraser, G. L.; Venkova, K.; Hoveyda, H. R.; Thomas, H.; Greenwood-Van Meerveld, B. Effect of the Ghrelin Receptor Agonist TZP-101 on Colonic Transit in a Rat Model of Postoperative Ileus. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *604*, 132–137.

Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1414–1425.

Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256–1272.

Galés, C.; Van Durm, J. J. J.; Schaak, S.; Pontier, S.; Percherancier, Y.; Audet, M.; Paris, H.; Bouvier, M. Probing the Activation-Promoted Structural Rearrangements in Preassembled Receptor-G Protein Complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 778–786.

Gaudreau, R.; Le Gouill, C.; Venne, M.-H.; Stankova, J.; Rola-Pleszczynski, M. Threonine 308 within a Putative Casein Kinase 2 Site of the Cytoplasmic Tail of Leukotriene B(4) Receptor (BLT1) Is Crucial for Ligand-Induced, G-Protein-Coupled Receptor-Specific Kinase 6-Mediated Desensitization. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31567–31576.

Gerbier, R.; Leroux, V.; Couvineau, P.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C.; Iturrioz, X. New Structural Insights into the Apelin Receptor: Identification of Key Residues for Apelin Binding. *FASEB J.* **2015**, *29*, 314–322.

Gershengorn, M. C.; Osman, R. Minireview: Insights into G Protein-Coupled Receptor Function Using Molecular Models. *Endocrinology* **2001**, *142*, 2–10.

Gether, U. Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90–113.

Gether, U.; Kobilka, B. K. G Protein-Coupled Receptors. II. Mechanism of Agonist Activation. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17979–17982.

Gilman, A. G. G Proteins and Dual Control of Adenylate Cyclase. *Cell* **1984**, *36*, 577–579.

Giordanetto, F.; Kihlberg, J. Macrocyclic Drugs and Clinical Candidates: What Can Medicinal Chemists Learn from Their Properties? *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 278–295.

Gurevich, V. V.; Gurevich, E. V. The Molecular Acrobatics of Arrestin Activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 105–111.

Guy, J. L.; Lambert, D. W.; Warner, F. J.; Hooper, N. M.; Turner, a J. Membrane-Associated Zinc Peptidase Families: Comparing ACE and ACE2. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 2–8.

Habata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Fukusumi, S.; Kawamata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Nishizawa, N.; Murosaki, S.; Kurokawa, T.; et al. Apelin, the Natural Ligand of the Orphan Receptor APJ, Is Abundantly Secreted in the Colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1452*, 25–35.

Hamada, J.; Kimura, J.; Ishida, J.; Kohda, T.; Morishita, S.; Ichihara, S.; Fukamizu, A. Evaluation of Novel Cyclic Analogues of Apelin. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 547–552.

Hashimoto, T.; Kihara, M.; Imai, N.; Yoshida, S.-I.; Shimoyamada, H.; Yasuzaki, H.; Ishida, J.; Toya, Y.; Kiuchi, Y.; Hirawa, N.; et al. Requirement of Apelin-Apelin Receptor System for Oxidative Stress-Linked Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **2007**, *171*, 1705–1712.

Heinonen, M. V.; Purhonen, a K.; Miettinen, P.; Pääkkönen, M.; Pirinen, E.; Alhava, E.; Akerman, K.; Herzig, K. H. Apelin, Orexin-A and Leptin Plasma Levels in Morbid Obesity and Effect of Gastric Banding. *Regul. Pept.* **2005**, *130*, 7–13.

Herbst, R. S. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *59*, 21–26.

Hirsch, J. a; Schubert, C.; Gurevich, V. V; Sigler, P. B. The 2.8 Å Crystal Structure of Visual Arrestin: A Model for Arrestin's Regulation. *Cell* **1999**, *97*, 257–269.

Hopkins, P. N. Molecular Biology of Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1317–1542.

Hosoya, M.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Fujii, R.; Habata, Y.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Honda, S.; Kurokawa, T.; Onda, H.; et al. Molecular and Functional Characteristics of APJ. Tissue Distribution of mRNA and Interaction with the Endogenous Ligand Apelin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21061–21067.

Hoveyda, H. R.; Marsault, E.; Gagnon, R.; Mathieu, A. P.; Vézina, M.; Landry, A.; Wang, Z.; Benakli, K.; Beaubien, S.; Saint-Louis, C.; et al. Optimization of the Potency and Pharmacokinetic Properties of a Macrocyclic Ghrelin Receptor Agonist (Part I): Development of Ulimorelin (TZP-101) from Hit to Clinic. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8305–8320.

Hus-Citharel, A.; Bouby, N.; Frugière, A.; Bodineau, L.; Gasc, J.-M.; Llorens-Cortes, C. Effect of Apelin on Glomerular Hemodynamic Function in the Rat Kidney. *Kidney Int.* **2008**, *74*, 486–494.

Ishida, J.; Hashimoto, T.; Hashimoto, Y.; Nishiwaki, S.; Iguchi, T.; Harada, S.; Sugaya, T.; Matsuzaki, H.; Yamamoto, R.; Shiota, N.; et al. Regulatory Roles for APJ, a Seven-Transmembrane Receptor Related to Angiotensin-Type 1 Receptor in Blood Pressure in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26274–26279.

Iturrioz, X.; Gerbier, R.; Leroux, V.; Alvear-Perez, R.; Maigret, B.; Llorens-Cortes, C. By Interacting with the C-Terminal Phe of Apelin, Phe255 and Trp259 in Helix VI of the Apelin Receptor Are Critical for Internalization. *J. Biol. Chem.* **2010a**, 285, 32627–32637.

Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; De Mota, N.; Franchet, C.; Guillier, F.; Leroux, V.; Dabire, H.; Le Jouan, M.; Chabane, H.; Gerbier, R.; et al. Identification and Pharmacological Properties of E339-3D6, the First Nonpeptidic Apelin Receptor Agonist. *FASEB J.* **2010b**, 24, 1506–1517.

Iyengar, R.; Birnbaumer, L. Hormone Receptor Modulates the Regulatory Component of Adenylyl Cyclase by Reducing Its Requirement for Mg²⁺ and Enhancing Its Extent of Activation by Guanine Nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, 79, 5179–5183.

Jaakola, V.-P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science* **2008**, 322, 1211–1217.

Japp, a G.; Cruden, N. L.; Barnes, G.; van Gemeren, N.; Mathews, J.; Adamson, J.; Johnston, N. R.; Denvir, M. a; Megson, I. L.; Flapan, a D.; et al. Acute Cardiovascular Effects of Apelin in Humans: Potential Role in Patients with Chronic Heart Failure. *Circulation* **2010**, 121, 1818–1827.

Japp, A. G.; Newby, D. E. The Apelin-APJ System in Heart Failure: Pathophysiologic Relevance and Therapeutic Potential. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 1882–1892.

Japp, A. G.; Cruden, N. L.; Amer, D. a B.; Li, V. K. Y.; Goudie, E. B.; Johnston, N. R.; Sharma, S.; Neilson, I.; Webb, D. J.; Megson, I. L.; et al. Vascular Effects of Apelin in Vivo in Man. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, 52, 908–913.

Jarpe, M. B.; Knall, C.; Mitchell, F. M.; Buhl, A. M.; Duzic, E.; Johnson, G. L. [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]Substance P Acts as a Biased Agonist toward Neuropeptide and Chemokine Receptors. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 3097–3104.

Kagiyama, S.; Fukuhara, M.; Matsumura, K.; Lin, Y.; Fujii, K.; Iida, M. Central and Peripheral Cardiovascular Actions of Apelin in Conscious Rats. *Regul. Pept.* **2005**, 125, 55–59.

Kahn, S. E.; Hull, R. L.; Utzschneider, K. M. Mechanisms Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Nature* **2006**, 444, 840–846.

Kälin, R. E.; Kretz, M. P.; Meyer, A. M.; Kispert, A.; Heppner, F. L.; Brändli, A. W. Paracrine and Autocrine Mechanisms of Apelin Signaling Govern Embryonic and Tumor Angiogenesis. *Dev. Biol.* **2007**, 305, 599–614.

- Kammermeier, P. J.; Ruiz-Velasco, V.; Ikeda, S. R. A Voltage-Independent Calcium Current Inhibitory Pathway Activated by Muscarinic Agonists in Rat Sympathetic Neurons Requires Both α_1 and β_1 . *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 5623–5629.
- Kang, Y.; Kim, J.; Anderson, J. P.; Wu, J.; Gleim, S. R.; Kundu, R. K.; McLean, D. L.; Kim, J.; Park, H.; Jin, S.; et al. Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development. *Circ. Res.* **2013**, *113*, 22–31.
- Kasai, A.; Shintani, N.; Oda, M.; Kakuda, M.; Hashimoto, H.; Matsuda, T.; Hinuma, S.; Baba, A. Apelin Is a Novel Angiogenic Factor in Retinal Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 395–400.
- Katugampola, S. D.; Maguire, J. J.; Matthewson, S. R.; Davenport, A. P. [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 Is a Novel Radioligand for Localizing the APJ Orphan Receptor in Human and Rat Tissues with Evidence for a Vasoconstrictor Role in Man. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1255–1260.
- Kawamata, Y.; Habata, Y.; Fukusumi, S.; Hosoya, M.; Fujii, R.; Hinuma, S.; Nishizawa, N.; Kitada, C.; Onda, H.; Nishimura, O.; et al. Molecular Properties of Apelin: Tissue Distribution and Receptor Binding. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1538*, 162–171.
- Kenakin, T. Agonist-Receptor Efficacy. II. Agonist Trafficking of Receptor Signals. *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*, 232–238.
- Kenakin, T. Efficacy at G-Protein-Coupled Receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 103–110.
- Kenakin, T.; Christopoulos, A. Signalling Bias in New Drug Discovery: Detection, Quantification and Therapeutic Impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 205–216.
- Kidoya, H.; Ueno, M.; Yamada, Y.; Mochizuki, N.; Nakata, M.; Yano, T.; Fujii, R.; Takakura, N. Spatial and Temporal Role of the apelin/APJ System in the Caliber Size Regulation of Blood Vessels during Angiogenesis. *EMBO J.* **2008**, *27*, 522–534.
- Kidoya, H.; Naito, H.; Takakura, N. Apelin Induces Enlarged and Nonleaky Blood Vessels for Functional Recovery from Ischemia. *Blood* **2010**, *115*, 3166–3174.
- Kimple, A. J.; Bosch, D. E.; Gigue, P. M. Regulators of G-Protein Signaling and Their G_{12/13} Substrates: Promises and Challenges in Their Use as. **2011**, *63*, 728–749.
- Kleinz, M. J.; Davenport, A. P. Immunocytochemical Localization of the Endogenous Vasoactive Peptide Apelin to Human Vascular and Endocardial Endothelial Cells. *Regul. Pept.* **2004**, *118*, 119–125.
- Kleinz, M. J.; Davenport, A. P. Emerging Roles of Apelin in Biology and Medicine. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *107*, 198–211.

Van Koppen, C. J.; Jakobs, K. H. Arrestin-Independent Internalization of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 365–367.

Kozasa, T.; Jiang, X.; Hart, M. J.; Sternweis, P. M.; Singer, W. D.; Gilman, A. G.; Bollag, G.; Sternweis, P. C. p115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **1998**, *280*, 2109–2111.

Krishnan, A.; Almén, M. S.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B. The Origin of GPCRs: Identification of Mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in Fungi. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–15.

Kuba, K.; Zhang, L.; Imai, Y.; Arab, S.; Chen, M.; Maekawa, Y.; Leschnik, M.; Leibbrandt, A.; Markovic, M.; Makovic, M.; et al. Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated with Aging and Pressure Overload. *Circ. Res.* **2007**, *101*, e32–e42.

Lagerström, M. C.; Schiöth, H. B. Structural Diversity of G Protein-Coupled Receptors and Significance for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 339–357.

Lambrecht, N. W. G.; Yakubov, I.; Zer, C.; Sachs, G. Transcriptomes of Purified Gastric ECL and Parietal Cells: Identification of a Novel Pathway Regulating Acid Secretion. *Physiol. Genomics* **2006**, *25*, 153–165.

Langelaan, D. N.; Rainey, J. K. Headgroup-Dependent Membrane Catalysis of Apelin-Receptor Interactions Is Likely. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10465–10471.

Langelaan, D. N.; Rainey, J. K. Membrane Catalysis of Peptide-Receptor Binding. *Biochem. Cell Biol.* **2010**, *88*, 203–210.

Langelaan, D. N.; Bebbington, E. M.; Reddy, T.; Rainey, J. K. Structural Insight into G-Protein Coupled Receptor Binding by Apelin. *Biochemistry* **2009**, *48*, 537–548.

Langelaan, D. N.; Reddy, T.; Banks, A. W.; Dellaire, G.; Dupré, D. J.; Rainey, J. K. Structural Features of the Apelin Receptor N-Terminal Tail and First Transmembrane Segment Implicated in Ligand Binding and Receptor Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1471–1483.

Lania, A. G.; Mantovani, G.; Spada, A. Mechanisms of Disease: Mutations of G Proteins and G-Protein-Coupled Receptors in Endocrine Diseases. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2006**, *2*, 681–693.

De Lean, a; Stadel, J. M.; Lefkowitz, R. J. A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7108–7117.

Lee, D. K.; Cheng, R.; Nguyen, T.; Fan, T.; Kariyawasam, a P.; Liu, Y.; Osmond, D. H.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 34–41.

Lee, D. K.; Saldivia, V. R.; Nguyen, T.; Cheng, R.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. Modification of the Terminal Residue of Apelin-13 Antagonizes Its Hypotensive Action. *Endocrinology* **2005**, *146*, 231–236.

Lee, D. K.; Ferguson, S. S. G.; George, S. R.; O'Dowd, B. F. The Fate of the Internalized Apelin Receptor Is Determined by Different Isoforms of Apelin Mediating Differential Interaction with Beta-Arrestin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 185–189.

Lefkowitz, R. J. Historical Review: A Brief History and Personal Retrospective of Seven-Transmembrane Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 413–422.

Li, Y.; Chen, J.; Bai, B.; Du, H.; Liu, Y.; Liu, H. Heterodimerization of Human Apelin and Kappa Opioid Receptors: Roles in Signal Transduction. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 991–1001.

Limbird, L. E. *Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods*; Springer.; 2005; p. 23.

Lipinski, C. a. Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2001**, *44*, 235–249.

Lipinski, C. a. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov. Today. Technol.* **2004**, *1*, 337–341.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.

Liu, C.; Su, T.; Li, F.; Li, L.; Qin, X.; Pan, W.; Feng, F.; Chen, F.; Liao, D.; Chen, L. PI3K/Akt Signaling Transduction Pathway Is Involved in Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Apelin-13. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **2010**, *42*, 396–402.

Liu, Y.; Feng, Q. NOing the Heart: Role of Nitric Oxide Synthase-3 in Heart Development. *Differentiation.* **2012**, *84*, 54–61.

Lv, S.-Y.; Qin, Y.-J.; Wang, N.-B.; Yang, Y.-J.; Chen, Q. Supraspinal Antinociceptive Effect of Apelin-13 in a Mouse Visceral Pain Model. *Peptides* **2012**, *37*, 165–170.

Ma, L.; Pei, G. Beta-Arrestin Signaling and Regulation of Transcription. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 213–218.

Macaluso, N. J. M.; Glen, R. C. Exploring the “RPRL” Motif of Apelin-13 through Molecular Simulation and Biological Evaluation of Cyclic Peptide Analogues. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1247–1253.

Macaluso, N. J. M.; Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Davenport, A. P.; Glen, R. C. Discovery of a Competitive Apelin Receptor (APJ) Antagonist. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1017–1023.

Maguire, J. J.; Kleinz, M. J.; Pitkin, S. L.; Davenport, A. P. [Pyr1]apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart: Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension* **2009**, *54*, 598–604.

Mallinson, J.; Collins, I. Macrocycles in New Drug Discovery. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1409–1438.

Maloney, P. R.; Khan, P.; Hedrick, M.; Gosalia, P.; Milewski, M.; Li, L.; Roth, G. P.; Sergienko, E.; Suyama, E.; Sugarman, E.; et al. Discovery of 4-Oxo-6-((pyrimidin-2-Ylthio)methyl)-4H-Pyran-3-Yl 4-Nitrobenzoate (ML221) as a Functional Antagonist of the Apelin (APJ) Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6656–6660.

Mann, A.; Wermuth, C. The Practice Of Medicinal Chemistry. In *Conformational restriction and/or steric hindrance in medicinal chemistry*; Wermuth, Ed.; 2008.

Margathe, J.-F.; Iturrioz, X.; Alvear-Perez, R.; Marsol, C.; Riché, S.; Chabane, H.; Tounsi, N.; Kuhry, M.; Heissler, D.; Hibert, M.; et al. Structure-Activity Relationship Studies toward the Discovery of Selective Apelin Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2908–2919.

Marinissen, M. J.; Gutkind, J. S. G-Protein-Coupled Receptors and Signaling Networks: Emerging Paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 368–376.

Marques, F. D.; Ferreira, A. J.; Sinisterra, R. D. M.; Jacoby, B. A.; Sousa, F. B.; Caliari, M. V.; Silva, G. A. B.; Melo, M. B.; Nadu, A. P.; Souza, L. E.; et al. An Oral Formulation of Angiotensin-(1-7) Produces Cardioprotective Effects in Infarcted and Isoproterenol-Treated Rats. *Hypertension* **2011**, *57*, 477–483.

Marsault, E.; Peterson, M. L. Macrocycles Are Great Cycles: Applications, Opportunities, and Challenges of Synthetic Macrocycles in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961–2004.

Marsault, E.; Hoveyda, H. R.; Peterson, M. L.; Saint-Louis, C.; Landry, A.; Vézina, M.; Ouellet, L.; Wang, Z.; Ramaseshan, M.; Beaubien, S.; et al. Discovery of a New Class of Macrocyclic Antagonists to the Human Motilin Receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7190–7197.

Martin, W. H. C.; Blechert, S. Ring Closing Metathesis in the Synthesis of Biologically Interesting Peptidomimetics, Sugars and Alkaloids. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1521–1540.

Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.

Masri, B.; Lahlou, H.; Mazarguil, H.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. Apelin (65-77) Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases via a PTX-Sensitive G Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 539–545.

Masri, B.; Morin, N.; Cornu, M.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. Apelin (65-77) Activates p70 S6 Kinase and Is Mitogenic for Umbilical Endothelial Cells. *FASEB J.* **2004**, *18*, 1909–1911.

Masri, B.; Morin, N.; Pedebernade, L.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. The Apelin Receptor Is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18317–18326.

Matsumoto, M.; Hidaka, K.; Akiho, H.; Tada, S.; Okada, M.; Yamaguchi, T. Low Stringency Hybridization Study of the Dopamine D4 Receptor Revealed D4-like mRNA Distribution of the Orphan Seven-Transmembrane Receptor, APJ, in Human Brain. *Neurosci. Lett.* **1996**, *219*, 119–122.

McClung, C. A. The Molecular Mechanisms of Morphine Addiction. *Rev. Neurosci.* **2006**, *17*, 393–402.

McGeary, R. P.; Fairlie, D. P. Macrocyclic Peptidomimetics: Potential for Drug Development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **1998**, *1*, 208–217.

Medhurst, A. D.; Jennings, C. a.; Robbins, M. J.; Davis, R. P.; Ellis, C.; Winborn, K. Y.; Lawrie, K. W. M.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J. E.; et al. Pharmacological and Immunohistochemical Characterization of the APJ Receptor and Its Endogenous Ligand Apelin. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 1162–1172.

Melnikova, I. Pain Market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 589–590.

Mesmin, C.; Dubois, M.; Becher, F.; Fenaille, F.; Ezan, E. Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry Assay for the Absolute Quantification of the Expected Circulating Apelin Peptides in Human Plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2875–2884.

El Messari, S.; Iturrioz, X.; Fassot, C.; De Mota, N.; Roesch, D.; Llorens-Cortes, C. Functional Dissociation of Apelin Receptor Signaling and Endocytosis: Implications for the Effects of Apelin on Arterial Blood Pressure. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 1290–1301.

Miettinen, K. H.; Magga, J.; Vuolteenaho, O.; Vanninen, E. J.; Punnonen, K. R.; Ylitalo, K.; Tuomainen, P.; Peuhkurinen, K. J. Utility of Plasma Apelin and Other Indices of Cardiac Dysfunction in the Clinical Assessment of Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Regul. Pept.* **2007**, *140*, 178–184.

Miller, S. J.; Blackwell, H. E.; Grubbs, R. H. Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9606–9614.

Mitra, A.; Katovich, M. J.; Mecca, A.; Rowland, N. E. Effects of Central and Peripheral Injections of Apelin on Fluid Intake and Cardiovascular Parameters in Rats. *Physiol. Behav.* **2006**, *89*, 221–225.

De Mota, N.; Lenkei, Z.; Llorens-Cortès, C. Cloning, Pharmacological Characterization and Brain Distribution of the Rat Apelin Receptor. *Neuroendocrinology* **2000**, *72*, 400–407.

De Mota, N.; Reaux-Le Goazigo, A.; El Messari, S.; Chartrel, N.; Roesch, D.; Dujardin, C.; Kordon, C.; Vaudry, H.; Moos, F.; Llorens-Cortés, C. Apelin, a Potent Diuretic Neuropeptide Counteracting Vasopressin Actions through Inhibition of Vasopressin Neuron Activity and Vasopressin Release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 10464–10469.

Murza, A.; Parent, A.; Besserer-Offroy, E.; Tremblay, H.; Karadereye, F.; Beaudet, N.; Leduc, R.; Sarret, P.; Marsault, É. Elucidation of the Structure-Activity Relationships of Apelin: Influence of Unnatural Amino Acids on Binding, Signaling, and Plasma Stability. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 318–325.

Murza, A.; Belleville, K.; Longpré, J.-M.; Sarret, P.; Marsault, E. Stability and Degradation Patterns of Chemically Modified Analogs of Apelin-13 in Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Biopolymers* **2014**, *102*, 297–303.

O'Carroll, a M.; Selby, T. L.; Palkovits, M.; Lolait, S. J. Distribution of mRNA Encoding B78/apj, the Rat Homologue of the Human APJ Receptor, and Its Endogenous Ligand Apelin in Brain and Peripheral Tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1492*, 72–80.

O'Carroll, a-M.; Lolait, S. J. Regulation of Rat APJ Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Magnocellular Neurones of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei by Osmotic Stimuli. *J. Neuroendocrinol.* **2003**, *15*, 661–666.

O'Carroll, A.-M.; Lolait, S. J.; Harris, L. E.; Pope, G. R. The Apelin Receptor APJ: Journey from an Orphan to a Multifaceted Regulator of Homeostasis. *J. Endocrinol.* **2013**, *219*, R13–R35.

O'Donnell, L. a; Agrawal, A.; Sabnekar, P.; Dichter, M. a; Lynch, D. R.; Kolson, D. L. Apelin, an Endogenous Neuronal Peptide, Protects Hippocampal Neurons against Excitotoxic Injury. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1905–1917.

O'Dowd, B. F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H. H.; Tsui, L. C.; Kennedy, J. L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S. R.; Nguyen, T. A Human Gene That Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome 11. *Gene* **1993**, *136*, 355–360.

Oakley, R. H.; Laporte, S. a; Holt, J. a; Caron, M. G.; Barak, L. S. Differential Affinities of Visual Arrestin, Beta arrestin1, and Beta arrestin2 for G Protein-Coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17201–17210.

Oda, K.; Matsuoka, Y.; Funahashi, A.; Kitano, H. A Comprehensive Pathway Map of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *Mol. Syst. Biol.* **2005**, *1*, 2005.0010.

Ohno, S.; Yakabi, K.; Ro, S.; Ochiai, M.; Onouchi, T.; Sakurada, T.; Takabayashi, H.; Ishida, S.; Takayama, K. Apelin-12 Stimulates Acid Secretion through an Increase of Histamine Release in Rat Stomachs. *Regul. Pept.* **2012**, *174*, 71–78.

Okada, K.; Arai, Y.; Hata, M.; Matsuyama, K.; Yano, M. Big Endothelin-1 Structure Important for Specific Processing by Endothelin-Converting Enzyme of Bovine Endothelial Cells. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 493–498.

Opal, S. M. The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History. *Crit. Care Clin.* **2009**, *25*, 637–663, vii.

Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. How Many Drug Targets Are There? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 993–996.

Pace, C. N.; Scholtz, J. M. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 422–427.

Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; et al. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000**, *289*, 739–745.

Pan, C.-S.; Teng, X.; Zhang, J.; Cai, Y.; Zhao, J.; Wu, W.; Wang, X.; Tang, C.-S.; Qi, Y.-F. Apelin Antagonizes Myocardial Impairment in Sepsis. *J. Card. Fail.* **2010**, *16*, 609–617.

Patgiri, A.; Menzenski, M. Z.; Mahon, A. B.; Arora, P. S. Solid-Phase Synthesis of Short A-Helices Stabilized by the Hydrogen Bond Surrogate Approach. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1857–1865.

Pauli, A.; Norris, M. L.; Valen, E.; Chew, G.-L.; Gagnon, J. a; Zimmerman, S.; Mitchell, A.; Ma, J.; Dubrulle, J.; Reyon, D.; et al. Toddler: An Embryonic Signal That Promotes Cell Movement via Apelin Receptors. *Science* **2014**, 1–13.

Perez, D. M. The Evolutionarily Triumphant G-Protein-Coupled Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1202–1205.

Pérez de Vega, M. J.; García-Aranda, M. I.; González-Muñiz, R. A Role for Ring-Closing Metathesis in Medicinal Chemistry: Mimicking Secondary Architectures in Bioactive Peptides. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 677–715.

Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Bonner, T. I.; Davenport, A. P. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin Receptor Nomenclature, Distribution, Pharmacology, and Function. *Pharmacol. Rev.* **2010a**, *62*, 331–342.

Pitkin, S. L.; Maguire, J. J.; Kuc, R. E.; Davenport, A. P. Modulation of the apelin/APJ System in Heart Failure and Atherosclerosis in Man. *Br. J. Pharmacol.* **2010b**, *160*, 1785–1795.

Pope, G. R.; Roberts, E. M.; Lolait, S. J.; O'Carroll, A.-M. Central and Peripheral Apelin Receptor Distribution in the Mouse: Species Differences with Rat. *Peptides* **2012**, *33*, 139–148.

Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene* **1992**, *111*, 229–233.

Raehal, K. M.; Schmid, C. L.; Groer, C. E.; Bohn, L. M. Functional Selectivity at the M-Opioid Receptor: Implications for Understanding Opioid Analgesia and Tolerance. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1001–1019.

Rajagopal, S.; Rajagopal, K.; Lefkowitz, R. J. Teaching Old Receptors New Tricks: Biasing Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 373–386.

Reaux, a; De Mota, N.; Skultetyova, I.; Lenkei, Z.; El Messari, S.; Gallatz, K.; Corvol, P.; Palkovits, M.; Llorens-Cortès, C. Physiological Role of a Novel Neuropeptide, Apelin, and Its Receptor in the Rat Brain. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 1085–1096.

Reaux, a; Gallatz, K.; Palkovits, M.; Llorens-Cortes, C. Distribution of Apelin-Synthesizing Neurons in the Adult Rat Brain. *Neuroscience* **2002**, *113*, 653–662.

Reaux-Le Goazigo, A.; Morinville, A.; Burlet, A.; Llorens-Cortes, C.; Beaudet, A. Dehydration-Induced Cross-Regulation of Apelin and Vasopressin Immunoreactivity Levels in Magnocellular Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* **2004**, *145*, 4392–4400.

Reaux-Le Goazigo, A.; Alvear-Perez, R.; Zizzari, P.; Epelbaum, J.; Bluet-Pajot, M.-T.; Llorens-Cortes, C. Cellular Localization of Apelin and Its Receptor in the Anterior Pituitary: Evidence for a Direct Stimulatory Action of Apelin on ACTH Release. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2007**, *292*, E7–E15.

Regard, J. B.; Sato, I. T.; Coughlin, S. R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell* **2008**, *135*, 561–571.

Reiser, M.; Hinrichsen, H.; Benhamou, Y.; Reesink, H. W.; Wedemeyer, H.; Avendano, C.; Riba, N.; Yong, C.-L.; Nehmiz, G.; Steinmann, G. G. Antiviral Efficacy of NS3-Serine Protease Inhibitor BILN-2061 in Patients with Chronic Genotype 2 and 3 Hepatitis C. *Hepatology* **2005**, *41*, 832–835.

Reiter, E.; Ahn, S.; Shukla, A. K.; Lefkowitz, R. J. Molecular Mechanism of B-Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 179–197.

Rhee, M. H.; Nevo, I.; Bayewitch, M. L.; Zagoory, O.; Vogel, Z. Functional Role of Tryptophan Residues in the Fourth Transmembrane Domain of the CB(2) Cannabinoid Receptor. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 2485–2491.

Roberts, E. M.; Newson, M. J. F.; Pope, G. R.; Landgraf, R.; Lolait, S. J.; O'Carroll, A.-M. Abnormal Fluid Homeostasis in Apelin Receptor Knockout Mice. *J. Endocrinol.* **2009**, *202*, 453–462.

Rominger, D. H.; Cowan, C. L.; Gowen-MacDonald, W.; Violin, J. D. Biased Ligands: Pathway Validation for Novel GPCR Therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *16C*, 108–115.

Ronkainen, V.-P.; Ronkainen, J. J.; Hänninen, S. L.; Leskinen, H.; Ruas, J. L.; Pereira, T.; Poellinger, L.; Vuolteenaho, O.; Tavi, P. Hypoxia Inducible Factor Regulates the Cardiac Expression and Secretion of Apelin. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1821–1830.

Rosenbaum, D. M.; Cherezov, V.; Hanson, M. a; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Yao, X.-J.; Weis, W. I.; Stevens, R. C.; et al. GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into beta2-Adrenergic Receptor Function. *Science* **2007**, *318*, 1266–1273.

Salcedo, A.; Garijo, J.; Monge, L.; Fernández, N.; Luis García-Villalón, A.; Sánchez Turrión, V.; Cuervas-Mons, V.; Diéguez, G. Apelin Effects in Human Splanchnic Arteries. Role of Nitric Oxide and Prostanoids. *Regul. Pept.* **2007**, *144*, 50–55.

Sargent, D. F.; Schwyzer, R. Membrane Lipid Phase as Catalyst for Peptide-Receptor Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 5774–5778.

Scimia, M. C.; Hurtado, C.; Ray, S.; Metzler, S.; Wei, K.; Wang, J.; Woods, C. E.; Purcell, N. H.; Catalucci, D.; Akasaka, T.; et al. APJ Acts as a Dual Receptor in Cardiac Hypertrophy. *Nature* **2012**, *488*, 394–398.

Scimia, M. C.; Blass, B. E.; Koch, W. J. Apelin Receptor: Its Responsiveness to Stretch Mechanisms and Its Potential for Cardiovascular Therapy. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2014**, *12*, 733–741.

Seamon, K.; Daly, J. W. Activation of Adenylate Cyclase by the Diterpene Forskolin Does Not Require the Guanine Nucleotide Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9799–9801.

Sheikh, A. Y.; Chun, H. J.; Glassford, A. J.; Kundu, R. K.; Kutschka, I.; Ardigo, D.; Hendry, S. L.; Wagner, R. A.; Chen, M. M.; Ali, Z. A.; et al. In Vivo Genetic Profiling and Cellular Localization of Apelin Reveals a Hypoxia-Sensitive, Endothelial-Centered Pathway Activated in Ischemic Heart Failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H88–H98.

Simonds, W. F. G Protein Regulation of Adenylate Cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 66–73.

Simpkin, J. C.; Yellon, D. M.; Davidson, S. M.; Lim, S. Y.; Wynne, A. M.; Smith, C. C. T. Apelin-13 and Apelin-36 Exhibit Direct Cardioprotective Activity against Ischemia-Reperfusion Injury. *Basic Res. Cardiol.* **2007**, *102*, 518–528.

Soriguer, F.; Garrido-Sanchez, L.; Garcia-Serrano, S.; Garcia-Almeida, J. M.; Garcia-Arnes, J.; Tinahones, F. J.; Garcia-Fuentes, E. Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Obes. Surg.* **2009**, *19*, 1574–1580.

Stupp, R.; Hegi, M. E.; Neyns, B.; Goldbrunner, R.; Schlegel, U.; Clement, P. M. J.; Grabenbauer, G. G.; Ochsenein, A. F.; Simon, M.; Dietrich, P.-Y.; et al. Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide with Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2712–2718.

Sunahara, R. K.; Taussig, R. Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Mol. Interv.* **2002**, *2*, 168–184.

Susaki, E.; Wang, G.; Cao, G.; Wang, H.-Q.; Englander, E. W.; Greeley, G. H. Apelin Cells in the Rat Stomach. *Regul. Pept.* **2005**, *129*, 37–41.

Szokodi, I.; Tavi, P.; Földes, G.; Voutilainen-Myllylä, S.; Ilves, M.; Tokola, H.; Pikkarainen, S.; Piihola, J.; Rysä, J.; Tóth, M.; et al. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 434–440.

Takeda, S.; Kadowaki, S.; Haga, T.; Takaesu, H.; Mitaku, S. Identification of G Protein-Coupled Receptor Genes from the Human Genome Sequence. *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 97–101.

Tang, S.-Y.; Xie, H.; Yuan, L.-Q.; Luo, X.-H.; Huang, J.; Cui, R.-R.; Zhou, H.-D.; Wu, X.-P.; Liao, E.-Y. Apelin Stimulates Proliferation and Suppresses Apoptosis of Mouse Osteoblastic Cell Line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt Signaling Pathways. *Peptides* **2007**, *28*, 708–718.

Tao, Y.-X. Inactivating Mutations of G Protein-Coupled Receptors and Diseases: Structure-Function Insights and Therapeutic Implications. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *111*, 949–973.

Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M. X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; et al. Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471–476.

Tatemoto, K.; Takayama, K.; Zou, M. X.; Kumaki, I.; Zhang, W.; Kumano, K.; Fujimiya, M. The Novel Peptide Apelin Lowers Blood Pressure via a Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *Regul. Pept.* **2001**, *99*, 87–92.

Terrillon, S.; Bouvier, M. Roles of G-Protein-Coupled Receptor Dimerization. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 30–34.

Thompson, M. D.; Burnham, W. M.; Cole, D. E. C. The G Protein-Coupled Receptors: Pharmacogenetics and Disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2005**, *42*, 311–392.

Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.

Ui, M.; Katada, T.; Murayama, T.; Kurose, H.; Yajima, M.; Tamura, M.; Nakamura, T.; Nogimori, K. Islet-Activating Protein, Pertussis Toxin: A Specific Uncoupler of Receptor-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1984**, *17*, 145–151.

Vassilatis, D. K.; Hohmann, J. G.; Zeng, H.; Li, F.; Ranchalis, J. E.; Mortrud, M. T.; Brown, A.; Rodriguez, S. S.; Weller, J. R.; Wright, A. C.; et al. The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 4903–4908.

Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; et al. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14838–14843.

Violin, J. D.; DeWire, S. M.; Yamashita, D.; Rominger, D. H.; Nguyen, L.; Schiller, K.; Whalen, E. J.; Gowen, M.; Lark, M. W. Selectively Engaging B-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *335*, 572–579.

Vogt, W. Oxidation of Methionyl Residues in Proteins: Tools, Targets, and Reversal. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 93–105.

Wang, G.; Anini, Y.; Wei, W.; Qi, X.; OCarroll, A.-M.; Mochizuki, T.; Wang, H.-Q.; Hellmich, M. R.; Englander, E. W.; Greeley, G. H. Apelin, a New Enteric Peptide: Localization in the Gastrointestinal Tract, Ontogeny, and Stimulation of Gastric Cell Proliferation and of Cholecystokinin Secretion. *Endocrinology* **2004**, *145*, 1342–1348.

Wang, G.; Kundu, R.; Han, S.; Qi, X.; Englander, E. W.; Quertermous, T.; Greeley, G. H. Ontogeny of Apelin and Its Receptor in the Rodent Gastrointestinal Tract. *Regul. Pept.* **2009**, *158*, 32–39.

Wang, W.; McKinnie, S. M. K.; Patel, V. B.; Haddad, G.; Wang, Z.; Zhabyeyev, P.; Das, S. K.; Basu, R.; McLean, B.; Kandalam, V.; et al. Loss of Apelin Exacerbates Myocardial Infarction Adverse Remodeling and Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutic Potential of Synthetic Apelin Analogues. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, *2*, e000249.

Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G. W.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. X. Structure of a beta1-Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486–491.

Van de Weghe, P.; Eustache, J. The Application of Olefin Metathesis to the Synthesis of Biologically Active Macrocyclic Agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1495–1519.

Wei, C.; Tung, D.; Yip, Y. M.; Mei, Y.; Zhang, D. Communication: The Electrostatic Polarization Is Essential to Differentiate the Helical Propensity in Polyalanine Mutants. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 171101.

Wess, J.; Nanavati, S.; Vogel, Z.; Maggio, R. Functional Role of Proline and Tryptophan Residues Highly Conserved among G Protein-Coupled Receptors Studied by Mutational Analysis of the m3 Muscarinic Receptor. *EMBO J.* **1993**, *12*, 331–338.

Wessjohann, L. A.; Ruijter, E.; Garcia-Rivera, D.; Brandt, W. What Can a Chemist Learn from Nature's Macrocycles?--a Brief, Conceptual View. *Mol. Divers.* **2005**, *9*, 171–186.

Whalen, E. J.; Rajagopal, S.; Lefkowitz, R. J. Therapeutic Potential of B-Arrestin- and G Protein-Biased Agonists. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 126–139.

Wilson, T.; Hastings, J. W. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 197–230.

Wise, A.; Gearing, K.; Rees, S. Target Validation of G-Protein Coupled Receptors. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 235–246.

Xie, H.; Tang, S.; Cui, R.; Huang, J.; Ren, X.; Yuan, L.; Lu, Y.; Yang, M.; Zhou, H.; Wu, X.; et al. Apelin and Its Receptor Are Expressed in Human Osteoblasts. *Regul. Pept.* **2006**, *134*, 118–125.

Xie, H.; Yuan, L.-Q.; Luo, X.-H.; Huang, J.; Cui, R.-R.; Guo, L.-J.; Zhou, H.-D.; Wu, X.-P.; Liao, E.-Y. Apelin Suppresses Apoptosis of Human Osteoblasts. *Apoptosis* **2007**, *12*, 247–254.

Xu, N.; Wang, H.; Fan, L.; Chen, Q. Supraspinal Administration of Apelin-13 Induces Antinociception via the Opioid Receptor in Mice. *Peptides* **2009**, *30*, 1153–1157.

Xu, Y.; Piston, D. W.; Johnson, C. H. A Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) System: Application to Interacting Circadian Clock Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 151–156.

Yao, B. B.; Witte, D. G.; Miller, T. R.; Carr, T. L.; Kang, C. H.; Cassar, S.; Faghih, R.; Bennani, Y. L.; Surber, B. W.; Hancock, a a; et al. Use of an Inverse Agonist Radioligand [3H]A-317920 Reveals Distinct Pharmacological Profiles of the Rat Histamine H3 Receptor. *Neuropharmacology* **2006**, *50*, 468–478.

Yu, X.-H.; Tang, Z.-B.; Liu, L.-J.; Qian, H.; Tang, S.-L.; Zhang, D.-W.; Tian, G.-P.; Tang, C.-K. Apelin and Its Receptor APJ in Cardiovascular Diseases. *Clin. Chim. Acta.* **2014**, *428*, 1–8.

Yue, P.; Jin, H.; Aillaud, M.; Deng, A. C.; Azuma, J.; Asagami, T.; Kundu, R. K.; Reaven, G. M.; Quertermous, T.; Tsao, P. S. Apelin Is Necessary for the Maintenance of Insulin Sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *298*, E59–E67.

Yue, P.; Jin, H.; Xu, S.; Aillaud, M.; Deng, A. C.; Azuma, J.; Kundu, R. K.; Reaven, G. M.; Quertermous, T.; Tsao, P. S. Apelin Decreases Lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* **2011**, *152*, 59–68.

Zeng, X. J.; Zhang, L. K.; Wang, H. X.; Lu, L. Q.; Ma, L. Q.; Tang, C. S. Apelin Protects Heart against Ischemia/reperfusion Injury in Rat. *Peptides* **2009**, *30*, 1144–1152.

Zeng, X. J.; Yu, S. P.; Zhang, L.; Wei, L. Neuroprotective Effect of the Endogenous Neural Peptide Apelin in Cultured Mouse Cortical Neurons. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1773–1783.

Zhang, Y. J.; Dragic, T.; Cao, Y.; Kostrikis, L.; Kwon, D. S.; Littman, D. R.; KewalRamani, V. N.; Moore, J. P. Use of Coreceptors Other than CCR5 by Non-Syncytium-Inducing Adult and Pediatric Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Rare in Vitro. *J. Virol.* **1998**, *72*, 9337–9344.

Zhang, Y.; Maitra, R.; Harris, D. L.; Dhungana, S.; Snyder, R.; Runyon, S. P. Identifying Structural Determinants of Potency for Analogs of Apelin-13: Integration of C-Terminal Truncation with Structure-Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2992–2997.

Zhen, E. Y.; Higgs, R. E.; Gutierrez, J. a. Pyroglutamyl Apelin-13 Identified as the Major Apelin Isoform in Human Plasma. *Anal. Biochem.* **2013**, *442*, 1–9.

Zhong, J.-C.; Yu, X.-Y.; Huang, Y.; Yung, L.-M.; Lau, C.-W.; Lin, S.-G. Apelin Modulates Aortic Vascular Tone via Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation Pathway in Diabetic Mice. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 388–395.

Zhou, N.; Fan, X.; Mukhtar, M.; Fang, J.; Patel, C. a; DuBois, G. C.; Pomerantz, R. J. Cell-Cell Fusion and Internalization of the CNS-Based, HIV-1 Co-Receptor, APJ. *Virology* **2003**, *307*, 22–36.

Zou, M. X.; Liu, H. Y.; Haraguchi, Y.; Soda, Y.; Tatemoto, K.; Hoshino, H. Apelin Peptides Block the Entry of Human Immunodeficiency Virus (HIV). *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 15–18.